

**Synthese von D-Phe/D-DiPhe-Pro-basierenden Liganden und deren
biophysikalischen Charakterisierung zur Selektivitätsstudie von
Thrombin und Trypsin sowie ein synthetischer Beitrag zur
Darstellung von Inhibitoren der Aldose-Reduktase und
Carboanhydrase II**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Trong Khang Ngo (M.Sc.)

aus Bad Homburg

Marburg, 2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe
Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Schlitzer

Eingereicht am 03.01.2020

Tag der mündlichen Prüfung am 14.02.2020

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Juni 2016 bis November 2019 angefertigt.

Danksagung

Aus Gründen des Persönlichkeitsschutzes wird von der elektronischen Veröffentlichung der Danksagung abgesehen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Summary	IX
Zusammenfassung.....	XI
Teil 1 – Thrombin und Trypsin.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Funktion und Struktur von Thrombin	2
1.1.1 Blutgerinnungskaskade	2
1.1.2 Struktureller Aufbau von Thrombin	2
1.1.3 Katalytische Triade	3
1.1.4 Natrium-Bindestellen	4
1.2 Thrombin-Inhibitoren in der Wirkstoffentwicklung.....	6
1.3 Thrombin vs. Trypsin	10
1.4 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	11
1.4.1 Aufbau, Funktion und theoretische Einführung in die ITC	11
1.4.2 Verdrängungstitration.....	13
1.4.3 Bestimmung von Protonierungseffekten	15
2 Zielsetzung.....	17
3 Synthese	19
3.1 Darstellung der D-Phe/D-DiPhe-Pro-basierenden Inhibitoren 10 und 11	19
3.2 Synthese des P1-Bausteins für Inhibitor 10a.....	20
3.2.1 Diaminierung über eine <i>Tschitschibabin</i> -Reaktion.....	20
3.2.2 Diaminierung über eine <i>Ullmann</i> -Reaktion.....	21
3.3 Synthese der Inhibitoren 10b, 10c und 11	27
4 Kristallographische Untersuchung.....	29
4.1 Allgemeines zur Proteinkristallisation	29
4.2 Kristallstrukturen der Inhibitoren 10a-c und 11	31
4.3 Weitere Kristallstrukturen von D-Phe-Pro-Derivaten	35

5	Thermodynamische Analyse der Inhibitoren 10a-c und 11 mit ITC	39
5.1	ITC-Datensammlung der Inhibitoren 10a-c und 11	40
5.2	Interpretation der Protonierungseffekte	42
5.3	Vergleich der thermodynamischen Bindungsprofile.....	44
5.4	Zusammenhang zwischen den Protonierungseffekten und Kristallstrukturen von 10a-c und 11	48
	5.4.1 Unterschiedliche Bindungsposen von Benzylamin-Derivaten in Thrombin und Trypsin	50
	5.4.2 Unterschiedliche Geometrien von <i>N</i> -Amidinopiperidin in Thrombin und Trypsin	54
6	Zusammenfassung.....	58
7	Experimental Section.....	61
7.1	General Information.....	61
7.2	General Procedures (GP) for the Synthesis	72
7.3	Detailed Procedures of Synthesized Compounds	73
7.3.1	Synthesis of Boc-D-Phe-Pro-OH (15a).....	75
7.3.2	Synthesis of Boc-D-DiPhe-Pro-OH (15b)	76
7.3.3	Synthesis of Inhibitor 10a	77
7.3.4	Synthesis of Inhibitor 10b	80
7.3.5	Synthesis of Inhibitor 10c	81
7.3.6	Synthesis of Inhibitor 11	82
7.3.7	Synthesis of Inhibitor 46	83
7.3.8	Synthesis of Inhibitor 49	84
Teil 2 – Aldose-Reduktase.....		87
8	Einleitung.....	88
8.1	Funktion und Struktur der humanen Aldose-Reduktase (ALR2)	88
8.1.1	Funktion von ALR2 im Polyol-Stoffwechselweg	88
8.1.2	Struktureller Aufbau von ALR2.....	89
8.1.3	Katalysemechanismus	90
8.2	Aldose-Reduktase-Inhibitoren in der Arzneimittelforschung.....	91
8.3	Studien zum Mechanismus der transienten Spezifitätstasche	93
9	Zielsetzung.....	96
10	Synthese	98

10.1	Darstellung von Inhibitor 11	98
10.2	Darstellung von Inhibitor 12	104
11	Zusammenfassung und Ausblick	105
12	Experimental Section.....	107
12.1	General Information.....	107
12.2	Procedures of Synthesized Compounds.....	108
12.2.1	Synthesis of Inhibitor 11.....	109
12.2.2	Synthesis of Inhibitor 12.....	111
Teil 3	– Carboanhydrase II.....	113
13	Einleitung.....	114
13.1	Funktion und Struktur der humanen Carboanhydrase II (hCAII)	114
13.1.1	Allgemeine Funktionen und Klassen von CAs.....	114
13.1.2	Struktureller Aufbau von hCAII	115
13.1.3	Katalysemechanismus	116
13.2	Sulfonamid-Liganden in der Wirkstoffentwicklung für CA	118
14	Zielsetzung.....	122
15	Synthese	123
15.1	Darstellung der Inhibitoren 16 und 17	123
15.2	Darstellung der Inhibitoren 18	124
15.2.1	Alkylierung von Tetrafluorbenzen 25 über eine metallkatalysierte Kreuzkupplung.....	125
15.2.2	Alkylierung von Tetrafluorbenzen 26 über eine Grignard-Reaktion	127
15.2.3	Alkylierung von Tetrafluorbenzen 23 über Lithiierung	127
16	Zusammenfassung.....	131
17	Experimental Section.....	134
17.1	General Information.....	134
17.2	General Procedures of Synthesized Compounds	134
17.3	Detailed Procedures of Synthesized Compounds	135
17.3.1	Synthesis of Inhibitor 16a.....	136
17.3.2	Synthesis of Inhibitor 16b	136
17.3.3	Synthesis of Inhibitor 16c.....	137
17.3.4	Synthesis of Inhibitor 17a	138

Inhaltsverzeichnis

17.3.5	Synthesis of Inhibitor 17b	138
17.3.6	Synthesis of Inhibitor 17c	138
17.3.7	Synthesis of Inhibitor 17d	139
17.3.8	Synthesis of Inhibitor 18a	139
17.3.9	Synthesis of Inhibitor 18b	140
17.3.10	Synthesis of Inhibitor 18c	140
17.3.11	Synthesis of Inhibitor 18d	141
17.3.12	Synthesis of Compound 24e	142
18	Appendix	143
18.1	Omit Maps of Complex Structures with Thrombin and Trypsin from Section 4.2.....	143
18.2	Omit Maps of Complex Structures with Thrombin and Trypsin from Section 4.3, 5.4.1 and 5.4.2.....	144
18.3	Numbering of Water Molecules	145
18.4	Thermograms and Binding Isotherms from ITC measurements	146
19	Molekülverzeichnis der synthetisierten Inhibitoren.....	149
20	Literaturverzeichnis.....	151
	Lebenslauf	164
	Erklärung	166

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Abb.	Abbildung
acac	Acetylaceton
ACES	<i>N</i> -(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
ALR	Aldose-Reduktase
<i>B</i> -factor	<i>Debye-Waller</i> Faktor
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarboxyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
br	breites Signal (broad)
°C	Grad Celsius
<i>c</i>	Konzentration; <i>Wiseman</i> -Parameter
CA	carbonic anhydrase
CAI	carbonic anhydrase inhibitor
Cbz	Benzyloxycarbonyl
COD	1,5-Cyclooctadien
d	Dublett
D	rechts (lat. dexter)
D	Debye
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHP	Dihydropyranyl
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
DMAP	Dimethyl-4-aminopyridin
DMEDA	<i>N,N'</i> -Dimethylethylendiamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppp	1,3-Bis(diphenylphosphino)propan
EDC · HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
eq	Äquivalent (equivalent)
ESI	Elektrospray-Ionisation

Abkürzungsverzeichnis

<i>et al.</i>	und andere (lat. et alii/ et alia)
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
F_c	berechnete Reflexamplituden
F_o	beobachtete Reflexamplituden
FPA	Fibrinopeptid A
FRE	Fibrinogen Recognition Exosite
G	<i>Gibbs</i> -Energie (freie Enthalpie)
g	Gramm
H	Enthalpie
H_{ion}	Ionisierungsenthalpie
H_{obs}	Beobachtete Enthalpie (experimentell bestimmte Enthalpie)
h	Stunde(n)
HBS	Heparin Binding Site
hCA	human carbonic anhydrase
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
hAR	humane Aldose-Reduktase
Hz	Hertz
IR	Infrarot
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
J	Spin-Spin-Kopplung
k_{cat}	Wechselzahl
k_m	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Extinktionswellenlänge/Emissionswellenlänge
L	links (lat. laevus)
LMWH	niedermolekulares Heparin (Low Molecular Weight Heparin)
m/m	<i>meta</i> /Multipllett; milli
M	Molar; molare Masse in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Me	Methyl
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
n	Stoffmenge
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)

Abkürzungsverzeichnis

NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
<i>o</i>	<i>ortho</i>
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDB	Protein Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
Ph	Phenyl
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
phen	Phenanthrolin
PIPES	Piperazin- <i>N,N'</i> -bis(2-Ethansulfonsäure)
pK _a / pK _s	acidity constant / Säurekonstante
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
PMFZ	4-Methyl-5-perfluoro-phenylcarboximido- δ^2 -1,3,4-thiadiazolin-2-sulfonamid
ppm	10 ⁻⁶ (parts per million)
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluensulfonat
quant.	quantitativ
<i>R</i>	ideale Gaskonstante
R _f	Retentionsfaktor
RT / rt	Raumtemperatur / room temperature (18-25 °C)
<i>S</i>	Entropie
<i>s</i>	Singulett
SRE	secondary recognition element (sekundäres Erkennungsmerkmal)
<i>t</i>	Triplett
<i>T</i>	Temperatur
TCCA	Trichlorisocyanursäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMHD	2,2,6,6-Tetramethylheptan-3,5-dion
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tricin	<i>N</i> -(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>u</i>	atomare Masse
UV	Ultraviolett
$\tilde{\nu}$	chemische Verschiebung
X-ray	Röntgenstrahlung
<i>z</i>	Ladung

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren (Aufgeführte Aminosäuren liegen in L-Form vor, wenn nicht anders angegeben.)

Ala	Alanin	Leu	Leucin
Arg	Arginin	Lys	Lysin
Asn	Asparagin	Met	Methionin
Asp	Asparaginsäure	Phe	Phenylalanin
Cys	Cystein	Pro	Prolin
Gln	Glutamin	Ser	Serin
Glu	Glutaminsäure	Thr	Threonin
Gly	Glycin	Trp	Tryptophan
His	Histidin	Tyr	Tyrosin
Ile	Isoleucin	Val	Valin

Summary

The first part of this thesis (chapters 1-7) presents a synthetic and biophysical study of a congeneric series of D-Phe/D-DiPhe-Pro based inhibitors for thrombin and trypsin. Both proteins are structurally highly related serine proteases which show differences in their preferred substrate recognition. Thrombin is Arg-specific, whereas trypsin cleaves peptide chains after Lys and Arg. They recognize the basic substrate head group via Asp189, located at the bottom of the S1 pocket. The synthesized inhibitors are crystallographically analyzed for both serine proteases and thermodynamically investigated by isothermal titration calorimetry (ITC) to describe and compare their binding properties in the S1 pocket. An enzyme-kinetic fluorescence assay also supports the biophysical characterization of these compounds toward both proteins. In order to elucidate selectivity characteristics of thrombin and trypsin more precisely, the protonation effects were investigated in the S1 pocket. Although both proteases have a highly similar S1 pocket, our results suggest a difference in the electrostatic properties of Asp189 which may correlate with their selectivity in substrate recognition. It is surprising that one ligand of the series binds to trypsin in protonated state at its P1 head group while it remains unprotonated in case of thrombin. For this ligand, a slight difference in the residual solvation structures is observed. Our data show that these differences may be caused by the specific sodium binding site which is only present in thrombin, but absent in trypsin. This may be further pronounced by the charged Glu192 at the rim of the S1 pocket in thrombin and is not affected by the uncharged Gln192 in trypsin. Here, the consideration of different pK_a values of the involved functional groups also play an essential role.

Furthermore, various fragments as well as D-Phe-Pro derivatives are presented in both proteins whose binding properties in the S1 pocket are characterized and compared.

The second part of this thesis (chapters 8-12) is a synthetic study of aldose reductase inhibitors with a (2-arylcarbamoyl-phenoxy)-acetic acid scaffold by varying benzyl moieties with different *m*-substituted withdrawing groups (here: sulfoxide and boronic acid). They are prepared for the investigation of the transient specificity pocket in aldose reductase. Electron-deficient aromatic systems can trigger an opening of the specificity pocket thus lead to favored interactions with Trp111. In order to understand the opening mechanism of this transient binding pocket, these synthesized compounds should be also used in mutagenesis studies. Our first crystallographic results and ITC experiments did not reveal any clear interpretation regarding this mechanism so far. Different desolvation properties of the inhibitors may also have an impact on this mechanism.

Summary

The third part of this thesis (chapters 13-17) is another synthetic study of a series of *p*-alkylated benzenesulfonamides and their ether derivatives as human carbonic anhydrase II (hCAII) inhibitors which are varied in their alkyl chain length. While the sulfonamide group binds anionically to Zn^{2+} , the aliphatic alkyl chain addresses the hydrophobic pocket in the active site. The binding events of these compounds in hCAII were investigated crystallographically, kinetically and thermodynamically by ITC. The results demonstrate the conformational changes and reveal effects of the importance of shape complementarity for the structure-binding relationship.

Additionally in this part, the synthesis of perfluorinated derivatives are presented which exhibit a different binding pattern in hCAII. A kinetic and thermodynamic study was also performed analogously according to the investigation of the non-fluorinated series. The acidity of the sulfonamide group is influenced by the strongly electron-withdrawing effects of the fluorine substituents which lead to putative different binding characteristics of the aromatic system in the active site of this protein.

Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 1-7) wird ein Syntheseprojekt einer kongenerischen Serie von D-Phe/D-DiPhe-Pro-basierenden Inhibitoren für Thrombin und Trypsin sowie deren biophysikalischen Charakterisierung vorgestellt. Beide Proteine sind strukturell hochgradig verwandte Serinproteasen, die Unterschiede in ihrer Substraterkennung aufweisen. Thrombin ist Arg-spezifisch, während Trypsin Peptidketten nach Lys und Arg spaltet. Sie erkennen die basischen Substratkopfgruppen über Asp189, das sich am Boden der S1-Tasche befindet. Die synthetisierten Inhibitoren werden sowohl kristallographisch für beide Serinproteasen analysiert als auch thermodynamisch über isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht, um ihre Bindungseigenschaften in der S1-Tasche zu beschreiben und zu vergleichen. Ein enzymkinetischer Fluoreszenzassay unterstützt zudem die biophysikalische Charakterisierung dieser Verbindungen gegenüber beiden Proteinen. Insbesondere steht dabei die Untersuchung von Protonierungseffekten in der S1-Tasche im Vordergrund, um die Selektivitätseigenschaften von Thrombin und Trypsin genauer aufzuklären. Obwohl beide Proteasen eine sehr ähnlich aufgebaute S1-Tasche haben, deuten die Ergebnisse auf einen Unterschied in den elektrostatischen Eigenschaften von Asp189 hin, welcher mit der Substratselektivität korrelieren könnte. Es ist überraschend, dass ein Ligand aus dieser Serie im protonierten Zustand mit seiner P1-Kopfgruppe an Trypsin bindet, während dieser im Komplex mit Thrombin unprotoniert bleibt. Für diesen Liganden wird ein leichter Unterschied bezüglich seiner Solvatationsmerkmale beobachtet. Unsere Daten zeigen, dass diese Unterschiede durch die spezifische Natriumbindestelle verursacht werden können, die nur in Thrombin vorhanden ist, aber in Trypsin fehlt. Während die Unterschiede außerdem durch das geladene Glu192 am Rand der S1-Tasche in Thrombin ausgeprägt werden können, werden sie durch das ungeladene Gln192 in Trypsin nicht beeinflusst. Dabei spielt die Berücksichtigung der verschiedenen pK_a -Werte der beteiligten funktionellen Gruppen ebenfalls eine wesentliche Rolle.

Weiterhin werden in diesem Teil verschiedene Fragmente sowie D-Phe-Pro-Derivate im Komplex mit beiden Proteinen vorgestellt, deren Bindungseigenschaften in der S1-Tasche charakterisiert und verglichen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit (Kapitel 8-12) wird die Synthese von Aldose-Reduktase-Inhibitoren mit einem 2-Arylcarbamoylphenoxyessigsäure-Gerüst durch die Einführung von verschiedenen Benzylgruppen mit *m*-ständigen elektronenziehenden Gruppen (hier: Sulfoxid und Boronsäure) vorgestellt. Sie dienen zur Untersuchung der transienten Spezifitätstasche in der Aldose-Reduktase. Elektronenarme aromatische Systeme können eine Öffnung der Spezifitätstasche auslösen und zu

Zusammenfassung

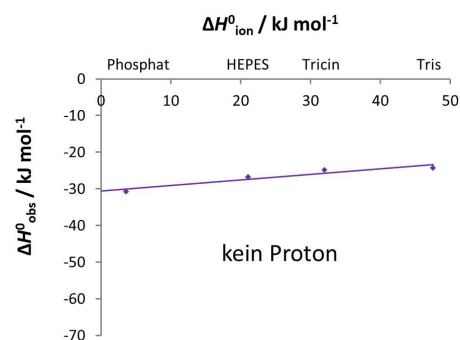
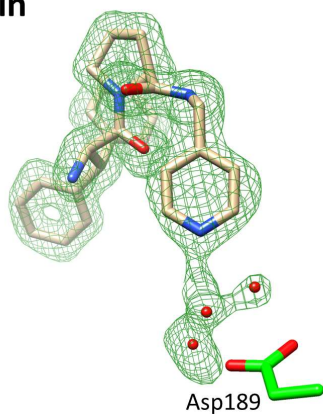
bevorzugten Wechselwirkungen mit Trp111 führen. Um den Öffnungsmechanismus dieser transienten Bindetasche genauer zu verstehen, sollten diese synthetisierten Verbindungen auch in verschiedenen Mutationsstudien eingesetzt werden. Unsere ersten kristallographischen Ergebnisse sowie ITC-Experimente zeigen bisher keine eindeutige Interpretation dieses Mechanismus. Unterschiedliche Desolvatationseigenschaften der Inhibitoren können einen Einfluss auf den Mechanismus haben.

Der dritte Teil dieser Arbeit (Kapitel 13-17) präsentiert eine weitere synthetische Untersuchung einer Serie von *p*-alkylierten Benzensulfonamiden und deren Etherderivaten als humane Carboanhydrase II (hCAII)-Inhibitoren, die schrittweise in ihrer Alkylkettenlänge variiert wurden. Während die Sulfonamidgruppe anionisch an Zn^{2+} bindet, adressiert die aliphatische Alkylkette die hydrophobe Tasche im aktiven Zentrum. Die Bindungsprozesse dieser Verbindungen an dieses Protein wurden kristallographisch, kinetisch und thermodynamisch über ITC analysiert. Es konnten Konformationsänderungen festgestellt werden, deren Effekte die Bedeutung der Formkomplementarität für die Struktur-Bindungsbeziehung aufdecken.

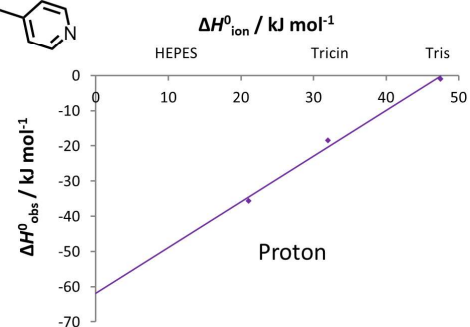
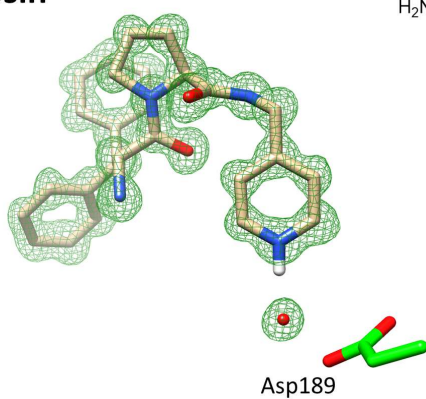
Zusätzlich wird in diesem Teil die Synthese von perfluorierten Derivaten vorgestellt, die ein anderes Bindungsmuster in hCAII aufweisen. Sowohl eine kinetische als auch thermodynamische Untersuchung wurde ebenfalls analog zur Studie der nicht-fluorierten Serie durchgeführt. Die Acidität der Sulfonamidgruppe ist durch die stark elektronenziehenden Effekte der Fluorsubstituenten beeinflusst, die vermutlich zum unterschiedlichen Bindungsverhalten des aromatischen Systems im aktiven Zentrum des Proteins führen.

Teil 1 – Thrombin und Trypsin

Thrombin



Trypsin



Dieser Teil der Doktorarbeit beinhaltet die Ergebnisse zur Selektivitätsstudie von Thrombin und Trypsin in den Kapiteln 1-7.

1 Einleitung

1.1 Funktion und Struktur von Thrombin

1.1.1 Blutgerinnungskaskade

Bei humanem α -Thrombin handelt es sich um eine Trypsin-ähnliche Serinprotease, die in allen Prozessen der Thrombose und Hämostase eine wichtige Rolle spielt.¹ In Abb. 1 wird die Blutgerinnungskaskade dargestellt, bei der Thrombin eine essentielle Funktion einnimmt. In dieser Kaskade wird zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen Weg unterschieden. Eine extrinsische Blutgerinnung wird durch eine Verletzung des Gefäßsystems verursacht, während beim intrinsischen Weg ein reduzierter Blutfluss oder pathogen veränderte Gefäßwände Auslöser sein können. Beide Wege münden über verschiedene Prozesse der Kaskade auf die Protease Faktor X, welche Prothrombin autokatalytisch und proteolytisch unter Bildung von Thrombin spaltet. Das aktivierte Thrombin überführt für die Blutgerinnung inaktives Fibrinogen in linear vernetzendes Fibrin, das durch Faktor XIIIa quervernetzt wird und zu einem Thrombus aggregiert.²

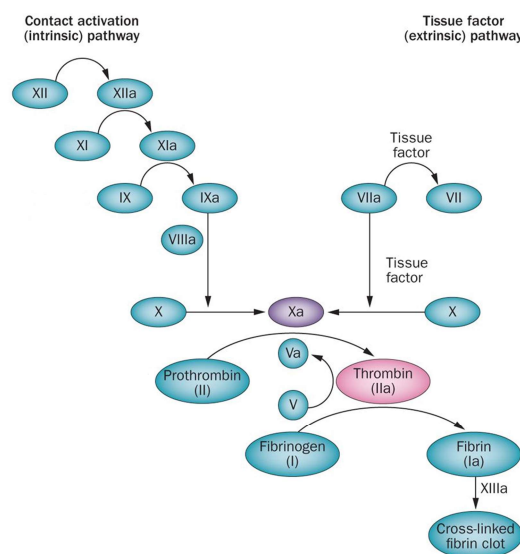


Abb. 1: Blutgerinnungskaskade modifiziert nach Sabir et al.²

1.1.2 Struktureller Aufbau von Thrombin

α -Thrombin besteht aus einer 36 Aminosäure langen A-Kette sowie einer 259 Aminosäure umfassenden B-Kette. Diese sind durch eine kovalente Disulfidbrücke verbunden.³ Um Prozesse wie die in Abb. 1 dargestellte Gerinnungskaskade koordinieren und kontrollieren zu können, benötigt Thrombin eine hohe Substratspezifität. Neben der katalytischen Triade (Ser-His-Asp) im aktiven

Zentrum besitzt Thrombin weitere strukturelle Merkmale, welche die erforderliche Substratspezifität ermöglichen. Zum einen besitzt Thrombin die starre 60er-Schleife, die mit kleinen hydrophoben Seitenketten wie Valin oder Prolin wechselwirken kann.⁴ Zum anderen gibt es den γ -Schleife, der im Vergleich zur 60er-Schleife wesentlich flexibler und hydrophiler ist.⁵ Die Selektivität des Enzyms wird zusätzlich durch die Anionenbindestellen *fibrinogene recognition domain* (*exosite I*) und *heparin binding site* (*exosite II*) bestimmt, welche sich auf der Oberfläche des Proteins befinden. Beide Bindungsdomänen sind zwar weit vom aktiven Zentrum entfernt, dennoch haben sie einen erheblichen Einfluss auf die spezifische Funktion von Thrombin.^{4,5} Da sie hauptsächlich aus basischen Aminosäuren wie Lysin oder Arginin bestehen, bevorzugen sie Substrate mit negativ geladenen Gruppen unter Bildung von elektrostatischen Wechselwirkungen (Abb. 2).^{5,6}

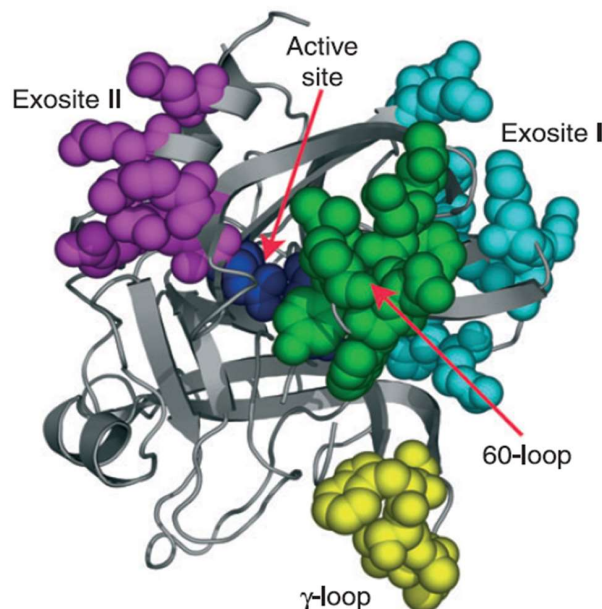


Abb. 2: Humanes α -Thrombin mit dem aktiven Zentrum um Ser195 (dunkelblau). 60er-Schleife (grün), γ -Schleife (gelb), Bereiche der *exosite I* (cyan) und *exosite II* (gelb). Abbildung ist entnommen aus *Crawley et al.*⁵

1.1.3 Katalytische Triade

Serinproteasen besitzen eine katalytische Triade aus Ser-His-Asp im aktiven Zentrum. Im Falle der trypsinähnlichen Proteasen erfolgt im ersten Schritt nach Abb. 3 ein nucleophiler Angriff durch die Hydroxygruppe des Ser195 auf die zu spaltende Amidgruppe (**a**). His57 verstärkt diesen Angriff nach Deprotonierung des Alkohols durch die Imidazolseitenkette, während das benachbarte Asp102 die resultierende positive Ladung des His57 kompensiert. Dabei wird ein tetraedrischer Übergangszustand gebildet, das durch ein Oxyanion-Loch (kleine Tasche neben Ser195 bestehend aus zwei NH-Gruppen von der schweren Hauptkette) stabilisiert wird (**b**). Anschließend erfolgt der Zerfall des

Übergangszustandes unter Abspaltung des Amins aus der aktiven Tasche (c). Im letzten Schritt wird das gebildete Acylenzym-Zwischenprodukt hydrolysiert und somit das *N*-terminale Spaltprodukt freigesetzt (c-d).⁷

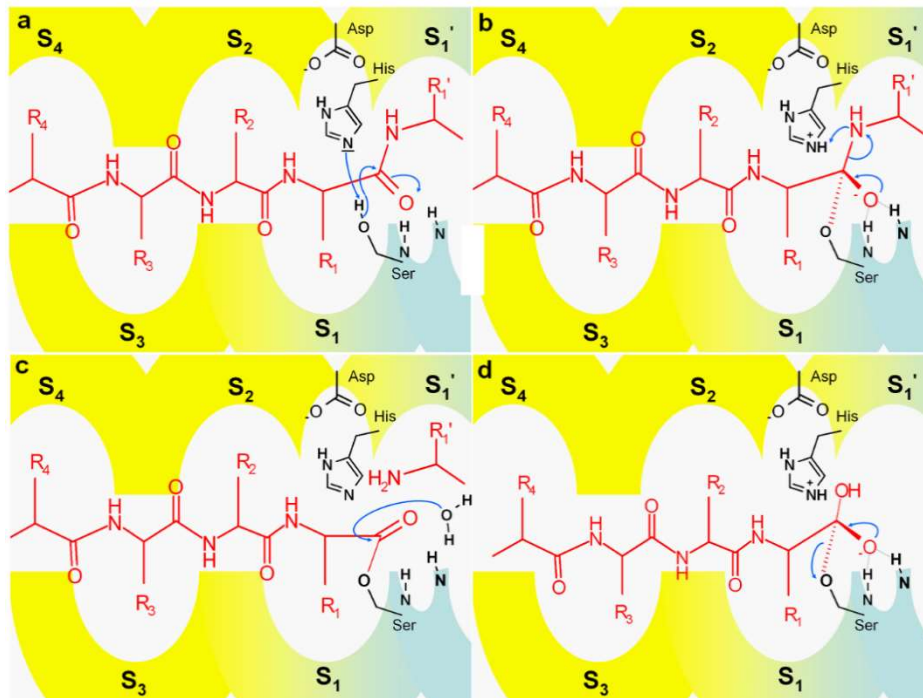


Abb. 3: Reaktionsmechanismus der katalytischen Triade, Abbildung ist aus Klebe entnommen.⁷

1.1.4 Natrium-Bindestellen

Orthner und *Kosow* untersuchten 1980 den Einfluss von monovalenten Natriumionen auf Thrombin.⁸ In ihren Studien konnten sie zeigen, dass Na^+ die Aktivität des Proteins stark erhöht und somit Substrate wie Fibrinogen deutlich schneller gespalten werden. Mit Hilfe von spektroskopischen Methoden wurden dabei Konformationsänderungen des Enzyms beobachtet, welche durch die spezifische Bindung von Na^+ ausgelöst werden.⁸

1995 konnten *Di Cera et al.*⁹ die Position von Na^+ innerhalb des Enzyms zum ersten Mal grob bestimmen, die schließlich zwei Jahre später von *Zhang* und *Tulinsky*¹⁰ mit der genauen Koordination gelöst wurde. Dabei wurden zwei Natrium-Bindestellen kristallographisch durch den Austausch von Na^+ gegen Rb^+ identifiziert. Ein Na^+ -Ion ist intermolekular an der Oberfläche zwischen zwei symmetrischen Thrombin-Molekülen gebunden, während die zweite Bindestelle sich in einem länglich gestreckten Lösungsmittelkanal (bestehend aus vier antiparallelen β -Faltblättern zwischen Cys182-Cys191 und Val213-Tyr228) in der Nähe von Asp189 befindet und auch die funktionsrelevante Bindestelle darstellt. Dabei liegt Na^+ oktaedrisch vor, koordiniert von den Carbonyl-Gruppen des Arg221A und Lys224 sowie von vier Wassermolekülen (Abb. 4).^{10,11}

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Einleitung

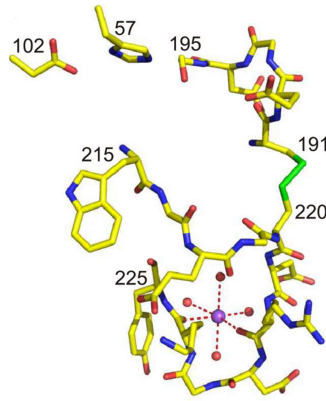


Abb. 4: Kristallographisch analysierte Natriumbindestelle neben der S1-Tasche von *Zhang* und *Tulinsky*¹⁰, Abbildung aus *Huntington* entnommen.¹¹

Eine umfassende Studie wurde 2004 von *Pineda et al.* zur Natrium-induzierten Konformationsänderung durchgeführt. Dabei sollten die Aminosäurereste von Thrombin identifiziert werden, die bei der Konformationsänderung durch die Koordination von Na^+ beeinflusst werden.¹² Zu diesem Zweck wurden diverse Alanin-Mutanten von Thrombin eingeführt und charakterisiert, aus denen die Effekte der Na^+ -Aktivität nach ihrer Stärke bestimmt wurden. In Abb. 5 werden die jeweiligen Regionen dargestellt, die bei einer Natrium-induzierten Konformationsänderung involviert sind. Es stellt sich heraus, dass die Aminosäurereste Asp189, Glu217, Asp222 und Tyr225 als allosterischer Kern identifiziert werden und in diesem Bereich die stärkste strukturelle Änderung durch eine Na^+ -Aktivierung stattfindet.¹²

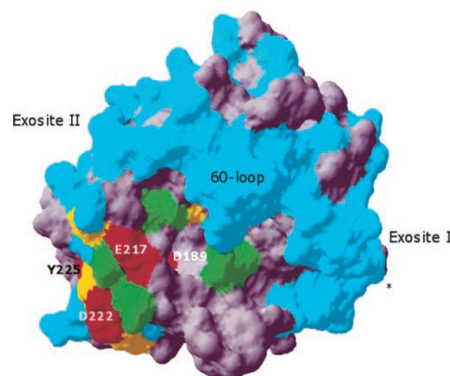
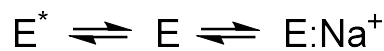


Abb. 5: Allosterischer Einfluss der jeweiligen Regionen durch Na^+ in Thrombin nach Ala-Mutation. Grün (moderater Einfluss), gelb (mittel) und rot (sehr stark). Die grauen Regionen wurden nicht mutiert. *Exosite I*, *exosite II* und der *60er*-Schleife besitzen keine Aminosäurereste, welche durch die Na^+ -Bindung beeinflusst werden. Abbildung ist entnommen aus *Pineda et al.*¹²

Bisher existieren weit über 200 PDB Strukturen von Thrombin in seiner *fast*-Form. Dabei handelt es sich in der Regel um Strukturen, die in Anwesenheit von Na^+ kristallisiert wurden. In den letzten Jahren wurden auch einige *slow*-Formen (Na^+ -freie Strukturen) in der PDB deponiert.¹¹ *Johnson et al.* stellten 2005 fest, dass hierbei eine geschlossene Konformation in der aktiven Tasche vorliegt, indem die S1

und S2-Tasche signifikant blockiert werden. Außerdem konnte dort ein nicht-katalytisches Wasserstoffbrückennetzwerk gefunden werden, welche die reduzierte Wechselzahl k_{cat} erklärt. Weiterhin befindet sich die Na^+ -Bindestelle in einer anderen Konformation als im Fall des Natrium-gebundenen Zustandes, während die Thrombin-Mutante E217K ähnliche Eigenschaften wie die Natrium freie Wildtypstruktur aufweist.¹³

2009 untersuchten *Gianni et al.* den Mechanismus der Na^+ -Bindung in Thrombin mit Hilfe von „ultra-schnellen“ kinetischen Methoden. Sie beobachteten, dass Konformationsänderungen des Proteins nicht durch die Na^+ -Bindung induziert werden, sondern diese Bindung eine im Gleichgewicht befindende Konformationsspezies stabilisiert wie in Schema 1 dargestellt.¹⁴



Schema 1: E^* ist die Konformation, welche nicht fähig ist eine Bindung von Liganden oder Na^+ eingehen zu können. E ist der bindungsfähige Zustand des Enzyms. $E:Na^+$ stellt die Na^+ -stabilisierte Konformation von E dar.

Demzufolge findet eine Konversion ausschließlich zwischen E und E^* bei der Na^+ -Bindung statt und dies auch der einzige Übergang ist, bei der eine Konformationsänderung auftreten kann. Ansonsten sind die Zustände E und $E:Na^+$, abgesehen von der Präsenz des Natriums, strukturell betrachtet nicht unterscheidbar. Na^+ dient hierbei nur zur Stabilisierung des Zustandes von E .¹⁴ Generell wird darüber diskutiert, wie letztendlich die Interpretation von *slow* und *fast*-Formen zu verstehen sind. Falls es sich nur um die Anwesenheit des Na^+ handelt, so müsste $E:Na^+$ als *fast*-Form und E sowie E^* als *slow*-Formen zu definieren sein. Betrachtet man hingegen die unterschiedlichen Konformationszustände, so müssten E und $E:Na^+$ als *fast*-Formen zu deklarieren sein, während nur der Zustand von E^* die *slow*-Form präsentiert.¹¹ Insgesamt zeigen die bisherigen Studien, wie komplex der allosterische Mechanismus in Thrombin abläuft und sensitive Methoden unter aussagekräftiger Strukturkontrolle benötigt werden, um kinetische Analysen vor allem bezüglich des Einflusses von Na^+ durchführen zu können. Insbesondere hat diese Wirkung signifikante physiologische Relevanz, da sie sowohl einen positiven Effekt auf die Aktivität als auch Spezifität für Thrombin haben.

1.2 Thrombin-Inhibitoren in der Wirkstoffentwicklung

Wie bereits in Abschnitt 1.1 erwähnt, spielt Thrombin eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Beispielsweise wird im Falle eines Schlaganfalls oder Herzinfarkts eine blutverdünnende, sprich reduzierte koagulierende Wirkung angestrebt, die mit Inhibitoren der Blutgerinnungskaskade erreicht werden soll. Entsprechende Medikamente werden als Antikoagulanzen bezeichnet, die eine hemmende Wirkung auf die Gerinnungskaskade haben. Daher ist die Forschung an solchen

Verbindungen, die selektiv und mit hoher Effizienz diese Wirkung erzielen können, von großem Interesse.^{7,15} Bei den ersten Antikoagulanzen handelt es sich um die Cumarine u.a. Dicumarol (**1**) und Warfarin (**2**), welche in den 1940er-1950er Jahren entwickelt wurden (Abb. 6). Die therapeutische Breite bei diesen Wirkstoffen ist hingegen sehr gering, sodass bei Überdosierung Blutungen auftreten bzw. bei nicht ausreichend effizienter Anwendung Thromben entstehen können.^{16,17}

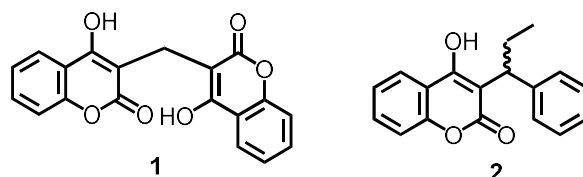


Abb. 6: Antikoagulanzen Dicumarol (**1**) und Warfarin (**2**).

Bereits 1937 wurde mit Heparin, ein weiterer Blutgerinnungshemmer, die ersten Studien am Menschen durchgeführt wurden. Diese zeigten allerdings auch ähnliche Probleme wie bei den Cumarinen bezüglich ihrer therapeutischen Breite und ihren Nebenwirkungen.¹⁸ Heparin ist ein Polysaccharid und es wird zwischen unfractioniertem (UFH) sowie niedermolekularem Heparin (LMWH) unterschieden.¹⁹ Während UFH zu einer Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) führen kann, ist eine kontrollierte Dosierung mit LMWHs möglich und dementsprechend lassen sich Immunreaktionen wie HIT besser vermeiden.²⁰ Die bisherigen Inhibitoren werden den klassischen Antikoagulanzen zugeordnet, die jedoch noch zahlreiche Nebenwirkungen besitzen und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit verbessert werden müssen. Folglich besteht ein medizinischer Bedarf an gut verträglichen Thrombin-Inhibitoren, die sowohl eine orale Anwendung als auch eine hohe therapeutische Breite haben.¹⁸

Da Thrombin am Ende der Gerinnungskaskade einen Einfluss auf das Blutgerinnungssystem hat, besteht ein großes Interesse Inhibitoren zu entwickeln, die direkt an dieser Stelle eingreifen sollen. Dabei wird Fibrinogen u.a. zu Fibrin und Fibrinopeptid A (FPA) gespalten. Die kompetitive inhibitorische Wirkung des FPA wurde schließlich von *Bettelheim*²¹ festgestellt und darauffolgend entdeckten *Blombäck et al.*, dass der Abstand zwischen den Aminosäuren in FPA ähnlich groß war wie zwischen der am Tripeptid D-Phe-Val-Arg¹⁸. Dabei bindet FPA mit seinen P8- und P9-Resten aus Leu und Phe in der S3-Tasche, indem es eine β -Schleife bildet, die sich in diese Tasche falten kann. Durch eine entsprechende Strukturbestimmung von *Stubbs et al.*²² ließ sich aufklären, weshalb das deutlich kürzere D-Phe-Val-Arg die Wechselwirkungen des natürlichen Substrats nachbilden kann. Darauf aufbauend forschte der Pharmakonzern *AstraZeneca* zunächst an der Entwicklung von direkten Thrombin-Inhibitoren basierend auf Pentapeptide wie D-Phe-Val-Arg-Gly-Pro. Weitere Untersuchungen zeigten bessere Resultate bei der Verwendung von Tripeptid-Derivaten basierend auf

der Sequenz D-Phe-Val-Arg. So konnte mit Inogatran (**3**), das eine gute Aktivität bei *in vitro*-Tests aufwies, ein erster kleiner Erfolg erzielt werden (Abb. 7).¹⁸

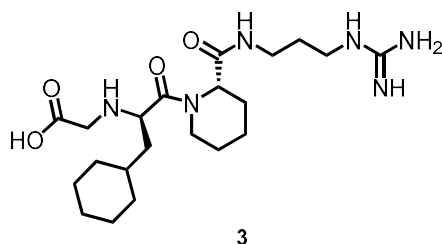


Abb. 7: Inogatran (**3**) basierend auf D-Phe-Val-Arg Sequenz.

Dennoch war auch hier die orale Bioverfügbarkeit nicht ausreichend und es wurde mit Melagatran (**4**) ein Wirkstoff entwickelt, der eine achtfach höhere Affinität bei *in vitro*-Tests hatte als Inogatran (**3**). Anhand der Molekülstruktur von Melagatran (**4**) ist in Abb. 8 zu erkennen, dass diese Substanz drei geladene Gruppen besitzt, bestehend aus einer Carbonsäuregruppe sowie den basischen Funktionalitäten mit einer Benzamidingruppe und einem sekundären Amin. Aufgrund dieser polaren Eigenschaften liegt Melagatran (**4**) im Magen-Darm-Trakt (pH 6-8) geladen und somit hoch hydratisiert vor, sodass eine Absorption dort nicht ausreichend stattfinden kann. Schließlich konnte mit Ximelagatran (**5**) ein oral verfügbares Prodrug entwickelt werden, das sich zunächst gut im Magen-Darm-Trakt absorbieren ließ und nach enzymatischer Spaltung zum gewünschten Melagatran (**4**) metabolisiert.¹⁸ Dabei wird Hydroxyamidin zum Amidin reduziert und anschließend der Ethylester zur Carbonsäure hydrolysiert.²³

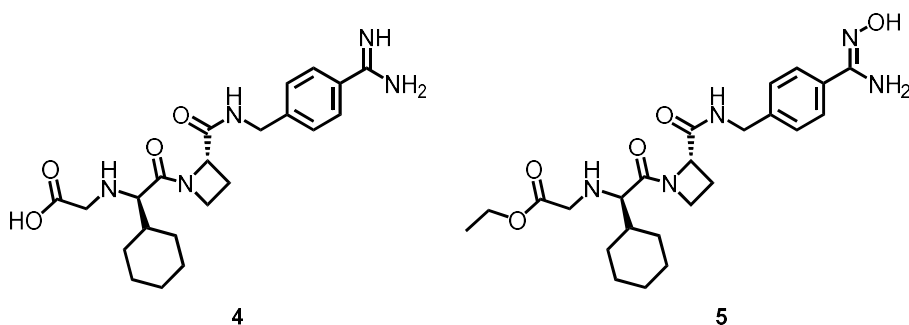


Abb. 8: Melagatran (**4**) und das oral bioverfügbare Prodrug Ximelagatran (**5**).

2004 konnte Ximelagatran (**5**) als erster oral verfügbarer Thrombin-Inhibitor auf den Markt gebracht werden, das jedoch 2006 wieder zurückgezogen werden musste, da die Einnahme des Medikamentes **5** Lebertoxizität verursachte.²⁴ In Abb. 9 wird das Prodrug Dabigatranetexilat (**6**) dargestellt, welches nach oraler Einnahme in das aktive Dabigatran (**7**) metabolisiert wird und ebenfalls eine gute reversible Inhibition in Thrombin aufweist. Allerdings bestehen auch hier Nebenwirkungen wie Verdauungsstörungen oder die Gefahr eines Herzinfarktes.²⁵

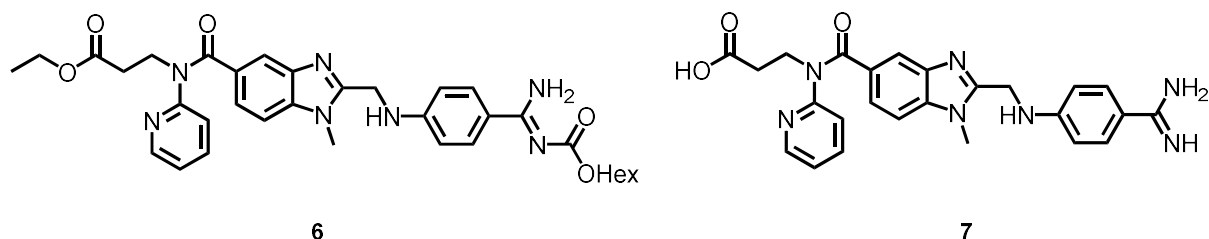


Abb. 9: Prodrug Dabigatranetexilat (**6**) metabolisiert zu Dabigatran (**7**).

Li et al. zeigten anhand von Fluor-Dabigatrandeivaten **8** und **9** in (Abb. 10, Tabelle 1), dass vergleichbare inhibitorische Aktivitäten bei *in vitro*-Tests wie für Dabigatran (**7**) auftraten. Es konnte festgestellt werden, dass **8** eine ähnliche Inhibitionsrate auf arterielle Thrombose besitzt wie Dabigatranetexilat (**6**).²⁶

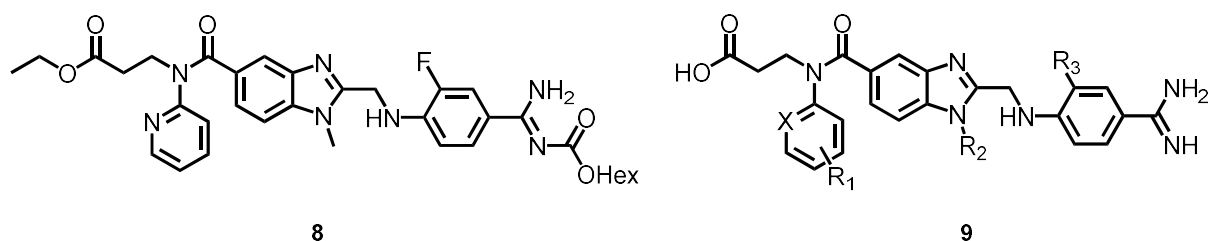


Abb. 10: Dabigatranetexilat Fluorderivat **8** und Dabigatran Fluorderivat **9**.

Tabelle 1: Reste der Fluorivate **9**.

Verbindung	X	R ₁	R ₂	R ₃
9a	N	H	Me	F
9b	C	2-F	Et	F
9c	C	2-F	Me	H
9d	N	H	Et	F

Bis heute gibt es noch keinen optimal oral verfügbaren und breit anwendbaren Thrombin-Inhibitor, bei dem sich die Nebenwirkungen gut regulieren lassen. Jedoch konnten viele Resultate in den letzten Jahren erzielt werden, weshalb es weiterhin ein interessantes und spannendes Forschungsgebiet bei der Entwicklung solcher Wirkstoffe bleibt.

1.3 Thrombin vs. Trypsin

In dieser vorliegenden Arbeit wurden die Serinproteasen Thrombin und Trypsin untersucht, die beide Substratspezifitäten aufweisen, welche besonders durch die Eigenschaften der S1-Tasche bestimmt werden. Die Proteine besitzen am Boden der S1-Tasche das Asp189, welches eine Salzbrücke zu basischen Aminosäuren bilden kann. Während Thrombin ausschließlich Argininreste in zu spaltenden Substratketten bevorzugt, zeigt Trypsin eine geringere Selektivität und bindet neben Arg auch Lys-Reste.⁷ Da in Trypsin sich an Position 190 ein Serin befindet (vgl. Ala190 in Thrombin), kann die Hydroxygruppe zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen mit der Aminogruppe von Lysin eingehen.²⁷ Hingegen besteht für Trypsin keine große Relevanz bezüglich der Spezifität in der S2-Tasche. Diese ist weitgehend offen und schwach ausgeprägt, sodass sie keine wichtige Rolle spielt.²⁸ Die S2-Tasche ist jedoch in Thrombin deutlich enger und räumlich begrenzter durch die bereits in Abschnitt 1.1.2 beschriebenen 60er-Schleife, welche vor allem Prolinreste an der P2-Position des Substrats bevorzugt, indem es „sandwich-artige“ Wechselwirkungen mit Tyr60A sowie Trp60D eingeht.²⁹ Bei der S3/4-Tasche handelt es sich um eine große hydrophobe Tasche, die aus der 172er-Schleife besteht und von Trp215 sowie Glu217 begrenzt ist. Dabei ist diese Tasche in Thrombin stärker abgegrenzt und verläuft wesentlich enger als in Trypsin. Der hydrophobe Charakter wird insbesondere durch Ile174 verstärkt (vgl. Gly174 in Trypsin). Zusätzlich kann Glu217 die 172er-Schleife stabilisieren, was mit Ser217 in Trypsin nicht möglich ist. Ein besonderes Merkmal für Trypsin ist die Ca^{2+} -Bindestelle. Diese wird durch die Schleife aus den Aminosäurenresten 70-80 aufgebaut, bei der Ca^{2+} oktaedrisch koordiniert ist (Abb. 11).²⁸ Das Kation ist zwar nicht an der Substratbindung direkt beteiligt, jedoch hat dieses einerseits einen gewissen Einfluss auf die proteolytische Aktivität von Trypsin und andererseits erhöht sie die Stabilität des Proteins und wirkt gegen den Selbstverdau.³⁰

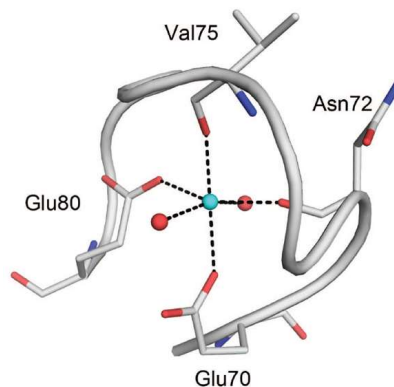


Abb. 11: Oktaedrische Koordination von Ca^{2+} in Trypsin durch Glu70, Glu80, zwei Wassermolekülen und zwei Carbonylgruppen jeweils vom Rückgrat des Asn72 sowie Val75. Abbildung ist aus Grüner entnommen.²⁸

Für therapeutische Anwendungen hat Trypsin als Verdauungsenzym keine breite Bedeutung als Zielstruktur für die Wirkstoffentwicklung erlangt. Allerdings besteht der Wunsch dieses Enzym bei der oralen Gabe von Inhibitoren der Blutgerinnung nicht massiv zu hemmen, um zum einen nicht die Dosis dieser Inhibitoren unnötig zu erhöhen und zum anderen unerwünschte Nebenwirkungen in Kauf zu nehmen. Weiterhin wird Trypsin gerne als Modellsystem für Serinproteasen verwendet, da bereits viele Studien am bovinen Trypsin durchgeführt wurden und sowohl für die experimentelle Anwendung gut handhabbar als auch kommerziell günstig zu erhalten ist. Schließlich sind Thrombin und Trypsin vor allem in der S1-Tasche strukturell sehr ähnlich, sodass sie sich für Vergleichsstudien gut eignen. Die kleinen bestehenden Unterschiede erzielen Selektivitäten z.B. in der Substraterkennung und können zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich des Verständnisses von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und selektivitätsbestimmenden Charakteristika führen.

1.4 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

1.4.1 Aufbau, Funktion und theoretische Einführung in die ITC

Bei der ITC handelt es sich um eine Titrationsmethode zur Bestimmung thermodynamischer Größen. Dabei lässt sich die Enthalpie ΔH° bei der Reaktion zwischen Protein und Ligand direkt messen. In Abb. 12 wird das Gerät schematisch dargestellt, welches aus einer Messzelle sowie einer Referenzzelle besteht, die von einem adiabatischen Mantel umschlossen sind und jeweils auf eine konstanten Temperatur gehalten werden. Während der ITC-Messung wird in aller Regel eine Ligandenlösung tropfenweise zu einer vorgelegten Proteinlösung des Proteins in der Messzelle titriert. Die Bindung des Liganden an das Protein kann je nach chemischer Reaktion exotherm oder endotherm ablaufen. Im Falle einer exothermen Reaktion wird weniger Energie bzw. Leistung benötigt, um die Temperaturunterschiede beider Zellen auf die gleiche Temperatur zu halten. Die Aufrechterhaltung der Temperatur in beiden Zellen erfolgt bei einer endothermen Reaktion entsprechend invers. Es entsteht ein Wärmesignal auf jede Eintropfung, das mit zunehmender Sättigung des Proteins abnimmt. In ein den Zeitablauf wiedergebendes Thermogramm wird die Leistung für die Erhaltung der Temperaturdifferenz als Funktion der Zeit aufgetragen (Abb. 12).^{7,31} Allerdings muss berücksichtigt werden, dass während der Titration einer Lösung in eine andere auch eine von der Reaktion unabhängige Verdünnungswärme entstehen kann, die bei der Auswertung entsprechend korrigiert werden muss, wie in Abschnitt 1.4.3 genauer erläutert wird.

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Einleitung

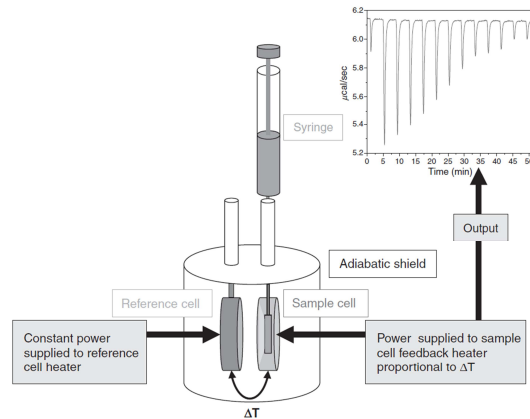


Abb. 12: Nach jeder Tropfenzugabe entstehen Wärmesignale, aus welcher das Thermogramm resultiert. Abbildung ist entnommen aus Freyer und Lewis.³²

Werden nun die Messsignale aus dem Thermogramm integriert, so ergibt sich die bei der Bindung summierte Wärmemenge ΔH° wie beispielhaft in Abb. 13 dargestellt.³³

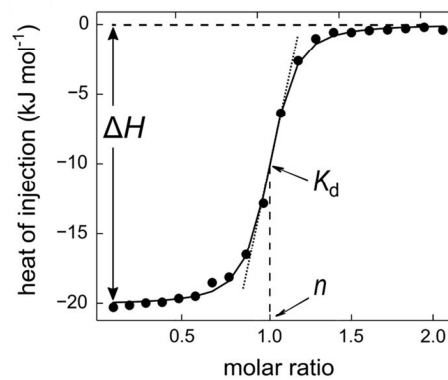


Abb. 13: Angepasste Isotherme aus den integrierten Wärmesignalen für jede Injektion. Im Wendepunkt der Isotherme lässt sich die Stöchiometrie der Umsetzung bestimmen sowie kann die Dissoziationskonstante K_d über einen linearen Fit im Wendepunkt ermittelt werden. Abbildung ist entnommen aus Krimmer und Klebe.³³

Zur Bestimmung der freien Gibbs'schen Enthalpie ΔG° wird Gleichung (1) verwendet:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a = RT \ln K_d \quad (1)$$

R = ideale Gaskonstante ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T = Temperatur, K_a = Assoziationskonstante, K_d = Dissoziationskonstante

Nachdem ΔH° direkt aus ITC-Messung und ΔG° nach Gleichung (1) bestimmt ist, lässt sich die Entropie der Bindung ΔS° bei vorgegebener Temperatur über die Differenz von ΔG° und ΔH° ermitteln:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (2)$$

Allgemein können Liganden mit Affinitäten von 10 nM bis 10 µM gemessen werden, um eine Titrationskurve zu erhalten, welche einen sigmoidalen Verlauf besitzen. Es müssen dabei möglichst viele Datenpunkte aus der Messung vorliegen, um bei der Anpassung der Kurve den Fit-Fehler gering zu halten. Je näher die Gestalt dieser Isotherme einer sigmoidalen Kurve ähnelt, umso geringer ist der Fehler bei der Bestimmung von K_a bzw. K_d . Des Weiteren hängt der Kurvenverlauf zusätzlich von der Proteinkonzentration in der Messzelle ab. Zur Abschätzung solcher Kurven dient der *Wiseman c*-Parameter, welcher nach Gleichung (3) berechnet werden kann.³⁴

$$c = n \cdot [P] \cdot K_a = \frac{n \cdot [P]}{K_d} \quad (3)$$

n = Anzahl der Bindestellen pro Proteinmolekül P , $[P]$ = Proteinkonzentration

Bei einem c -Wert von 10-1000 lassen sich akzeptable K_a abschätzen, bei welcher die Kurven einen typisch sigmoidalen Verlauf besitzen. In Abb. 14 sind Beispiele von Isothermen mit verschiedenen c -Werten aufgetragen. Es lässt sich feststellen, dass bei $c < 1$ die Kurve hyperbolischer wird, die keinen Wendepunkt zur Bestimmung der Stöchiometrie sowie K_a ermöglicht. Bei $c > 1000$ würden beide Plateaus stark abgetrennt verlaufen (bzw. das erste Plateau wird nicht erzielt) und ein sprunghafter Übergang würde entstehen, sodass keine Datenpunkte auf dem steilen Kurvenverlauf zu erhalten wären.³⁴

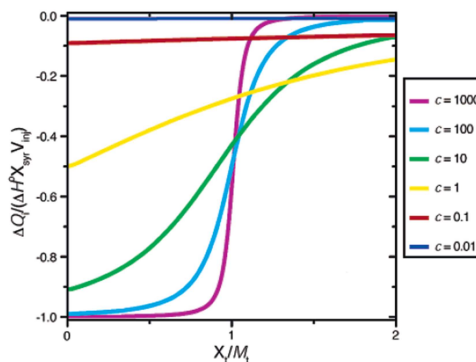


Abb. 14: Darstellung der *Wiseman*-Isotherme mit unterschiedlichen c -Werten. Zeitliche Kurvenverläufe, bei der die Wärmemenge ΔQ (jeweils normalisiert zu ΔH° und der Stoffmenge des Liganden für jede einzelne Injektion) gegen das Verhältnis der Konzentrationen von Ligand X zu Protein M aufgetragen ist.³⁵

1.4.2 Verdrängungstitration

Im idealen Fall lassen sich viele Liganden, die im zweistellig bis dreistellig nanomolaren Bereich binden, für die Bestimmung der thermodynamischen Parameter direkt titrieren wie sie im oberen Abschnitt erklärt wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Ligand zu stark an das Protein bindet und damit

Isotherme erzielt werden, welche einen c -Wert > 1000 besitzen und die entsprechende Assoziationskonstante schwierig zu ermitteln ist. Auch wenn direkte Titrationsen mit der ITC unter diesen Bedingungen zur K_a -Bestimmung nicht möglich sind, so lässt sich dieses Problem dennoch über eine Verdrängungstitration beheben, zu welcher *Sigurdskjold* bereits die ersten Theorien aufstellte.³⁶ Werden hingegen schwach bindende Liganden ($> 10 \mu\text{M}$) titriert, entsteht auch in diesem Fall keine passende sigmoidale Kurve. Hierbei wäre ein c -Wert < 10 erreicht, bei der ein ungenauer Wendepunkt der Isotherme für die Auswertung vorliegt. Dafür kann ebenfalls eine Verdrängungstitration Abhilfe schaffen, indem das Protein zunächst mit dem schwachen Liganden gesättigt wird und während der Messung injektionsweise ein starker Ligand zugegeben wird, bis schließlich der schwache Binder im Protein komplett verdrängt wird.³⁷

Dabei muss der starke Verdrängungsligand eine wesentlich höhere oder niedrigere Bindungsenthalpie besitzen, damit die Wärmedifferenz zwischen beiden Liganden nicht während der Reaktion ausgeglichen wird. Weiterhin muss der stärkere Ligand eine wesentlich höhere Affinität als der zu untersuchende schwach potente Ligand haben, um diesen vollständig verdrängen zu können.³⁸ Die Assoziationskonstante $K_{a,w}$ für den schwachen Liganden lässt sich über Gleichung (4) berechnen:³⁷

$$K_{a,w} = \left(\frac{K_{a,s}}{K_{a,dis}} - 1 \right) \frac{1}{[L]_w} \quad (4)$$

$K_{a,s}$ = Assoziationskonstante des starken Verdrängungsliganden, $K_{a,dis}$ = Gemessene Assoziationskonstante der Verdrängungstitration, $[L]_w$ = Konzentration des schwachen Liganden

$K_{a,w}$ kann schließlich in Gleichung (5) zur Bestimmung der Bindungsenthalpie ΔH°_w des schwachen Binders eingesetzt werden:

$$\Delta H^\circ_w = (\Delta H^\circ_s - \Delta H^\circ_{dis}) \left(1 + \frac{1}{K_{a,w} [L]_w} \right) \quad (5)$$

ΔH°_s = Bindungsenthalpie des starken Liganden, ΔH°_{dis} = Gemessene Bindungsenthalpie der Verdrängungstitration

Eine weitere Methode wäre eine *low-c-value* Titration, bei welcher der schwache Ligand direkt zur Proteinlösung titriert wird und daraus der enthalpische Beitrag ermittelt werden kann. Hier sind allerdings Annahmen über das Bindungsmodell und die Stöchiometrie der Umsetzung zu treffen. Sollten Probleme bezüglich der Proteinlöslichkeit auftauchen oder die Verfügbarkeit des Proteins begrenzt sein, bietet diese Titrationsmethode die günstigste Alternative, um auswertbare Isotherme (für $c = 1, 0.1$ und 0.01) wie in Abb. 15 dargestellt zu erhalten.³¹

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Einleitung

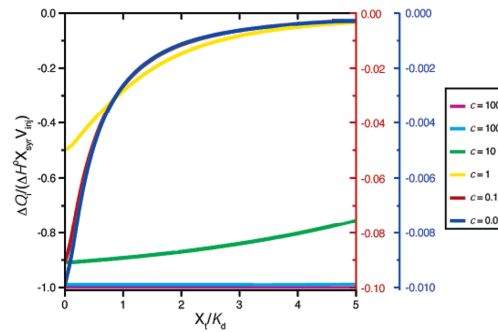


Abb. 15: Verschiedene Wiseman-Isothermen, bei der die Wärmemenge ΔQ (jeweils normalisiert zu ΔH° und der Stoffmenge des Liganden für jede einzelne Injektion) gegen das Verhältnis der Konzentrationen von Ligand X zur Dissoziationskonstanten K_d aufgetragen ist. Angepasste Skala für die y-Achse befindet sich auf der rechten Seite für $c = 0.1$ (rot) und $c = 0.01$ (dunkelblau). Abbildung ist aus Turnbull und Daranas entnommen.³⁵

Anhand der Abb. 15 ist deutlich zu erkennen, dass *low-c-value* Titrationsen für $c > 10$ Kurvenverläufe haben, die einen nicht zu definierenden Wendepunkt besitzen. Zwar gilt für $c < 10$ ein ähnliches Problem, dennoch lässt sich dieser zumindest grob bestimmen. Bedingung für solche *low-c-value* Titrationsen wäre, dass ein hoher Überschuss des Liganden verwendet wird, um genügend starke enthalpische Signale zu garantieren und das Protein letztendlich nahezu gesättigt werden kann. Dabei muss außerdem eine Konzentration des schwachen Binders in der Messzelle erreicht werden, bei welcher der eigene K_d überschritten wird.^{35,38} In einem unabhängigen Experiment z.B. ein enzymkinetischer Fluoreszenzassay kann dabei mit Hilfe der Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i die Abschätzung des K_d -Wertes unterstützen. Um letztendlich die Ergebnisse, vor allem den relativ ungenauen K_d -Wert, aus einer direkten *low-c-value* Titration bestätigen zu lassen, kann eine Verdrängungstitration durchgeführt werden. Auch in diesem Fall dient ein K_i -Wert aus einem enzymkinetischen Assay als Orientierung für die Berechnung der Konzentration des schwachen Liganden bei der Verdrängungstitration, um die gewünschte Sättigung des Proteins zu erreichen.³⁹

1.4.3 Bestimmung von Protonierungseffekten

Das bei der ITC beobachtete Wärmesignal besteht nicht nur ausschließlich aus der Bindungsenthalpie ΔH°_b . Dieser Beitrag wird u.a. von der Verdünnungswärme ΔH°_{dil} sowie der beim Protonenaustausch entstandenen Wärmemenge $\Delta n_{H^+} \cdot \Delta H^\circ_{ion}$ für die Protonenabnahme bzw. Aufnahme durch den Puffer unter Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes im Puffersystem überlagert, welche einen erheblichen Beitrag zur Enthalpie leisten können.^{28,40} Dabei können Protonen zwischen Protein, Ligand, Protein-Ligand-Komplex und dem Puffer im Gleichgewichtssystem untereinander ausgetauscht werden.^{41,42} Demzufolge müssen solche Protonierungseffekte bei der Auswertung von ITC-Daten berücksichtigt werden, die sowohl vom vorliegenden Puffersystem (pH und Ionisierungsenthalpie) als auch von den pK_s -Werten der beteiligten funktionellen Gruppen des

Liganden und Proteins abhängen. Dies ist notwendig, da sonst das thermodynamische Bindungsprofil verfälscht wäre. Somit gilt für die beobachtete gemessene Enthalpie ΔH°_{obs} nach Gleichung (6):^{28,43}

$$\Delta H^\circ_{obs} = \Delta H^\circ_b + \Delta H^\circ_{dil} + \Delta n_{H^+} \cdot \Delta H^\circ_{ion} + \Delta H^\circ_{divers} \quad (6)$$

ΔH°_{divers} = ggf. überlagerte Enthalpiebeiträge

Weiterhin gilt nach Umstellung von Gleichung (6) zu (7), nachdem um die Verdünnungswärme ΔH°_{dil} für ΔH°_{obs} korrigiert wird:

$$\Delta H^\circ_{obs-dil} = \Delta n_{H^+} \cdot \Delta H^\circ_{ion} + \Delta H^\circ_{corr} \quad (7)$$

ΔH°_{corr} = Puffer-korrigierte Bindungsenthalpie

Da es sich bei ΔH°_{divers} um einen sehr geringen Beitrag handelt, lässt sich Gleichung (7) als Geradengleichung vereinfacht darstellen. Schließlich kann (7) in eine lineare Funktion überführt werden, indem die Ionisierungsenthalpie des verwendeten Puffers ΔH°_{ion} gegen $\Delta H^\circ_{obs-dil}$ aufgetragen wird (Abb. 16). Hier entspricht $\Delta H^\circ_{obs-dil}$ bereits der um die Verdünnungswärme korrigierten Bindungsenthalpie.²⁸

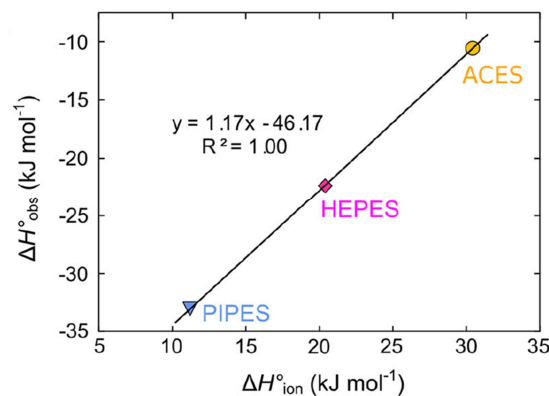


Abb. 16: Beispiel einer linearen Auftragung zur Pufferabhängigkeit (hier: drei verschiedene Puffersysteme) einer Protein-Ligand-Bindung in der ITC. Die Puffer-korrigierte Bindungsenthalpie ΔH°_{corr} wird durch den y-Achsenabschnitt beschrieben. Die Steigung Δn_{H^+} der Geradengleichung gibt die Anzahl von Protonen an, welche im gesamten Prozess in der ITC übertragen wurden. Eine positive Steigung bedeutet eine Nettoaufnahme von Protonen bei der Bildung des Komplexes, während eine negative Steigung eine Nettoabgabe an den Puffer entspricht. Abbildung ist entnommen aus Krimmer und Klebe.³³

Im Idealfall sollten die Messwerte aus der ITC alle auf einer Geraden, wie in Abb. 16 beispielhaft gezeigt, liegen. Dementsprechend muss vorausgesetzt werden, dass die Puffer im gemessenen pH-Bereich abpuffern können. Die Puffer müssen so gewählt werden, dass sie sich voneinander in ihren Ionisierungsenthalpien ausreichend unterscheiden. Folglich wird damit eine Pufferabhängigkeit bei der Bildung des Protein-Ligand-Komplexes garantiert und eine Interpretation über die Änderungen im Protonierungszustand am sichersten gewährleistet.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieses Projektes sollten potentielle D-Phe/D-DiPhe-Pro-basierende Inhibitoren **10** und **11** für Thrombin und Trypsin synthetisiert werden (Abb. 17). Es handelt sich hierbei um (Amino)pyridin-Derivate, die unterschiedliche Substitutionsmuster im Bereich des P1-Bausteins besitzen.

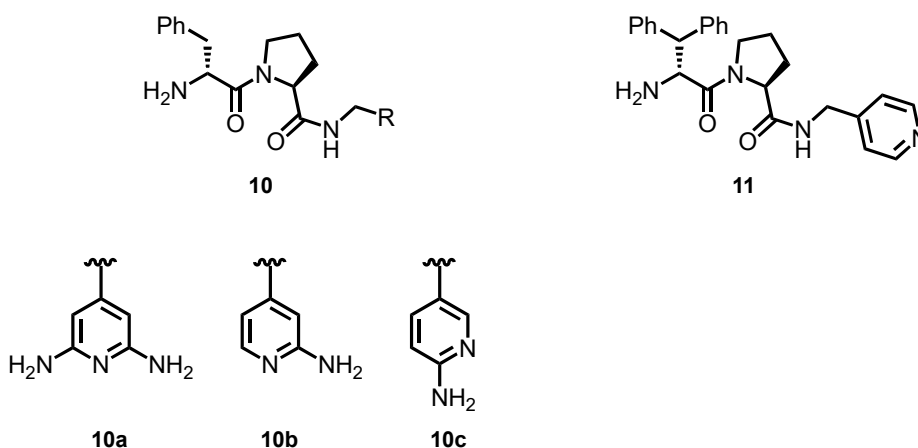


Abb. 17: D-Phe/D-DiPhe-Pro-basierende Inhibitoren **10** und **11**.

Die erhaltenen Inhibitoren **10** und **11** sollten für beide Serinproteasen sowohl kristallographisch analysiert als auch thermodynamisch mit ITC-Messungen untersucht werden, um ihre Bindungseigenschaften in der S1-Tasche beschreiben und vergleichen zu können. Ein enzymkinetischer Fluoreszenzassay sollte ebenfalls durchgeführt werden, welcher die biophysikalische Charakterisierung dieser Verbindungen an die Proteine unterstützen kann. Aus bisherigen Studien^{44–46} ist bekannt, dass ein D-DiPhe-Pro-Grundgerüst die Affinität erhöht und somit durch die Einführung einer zweiten Phenylgruppe am P3-Baustein des Inhibitors **11** eine direkte Titration in der ITC erleichtern sollte. Vor allem galt der Fokus bei der Untersuchung von Protonierungseffekten in der S1-Tasche, um Selektivitätsmerkmale von Thrombin und Trypsin genauer interpretieren zu können, weshalb sie trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterschiedliche Präferenzen bei der Substraterkennung haben (Arg für Thrombin, Arg und Lys für Trypsin). Hierbei spielte auch die Betrachtung verschiedener pK_s -Werte der jeweils beteiligten Gruppen eine essentielle Rolle. In Abb. 18 wird beispielhaft Inhibitor **10** in der aktiven Tasche von Thrombin präsentiert.

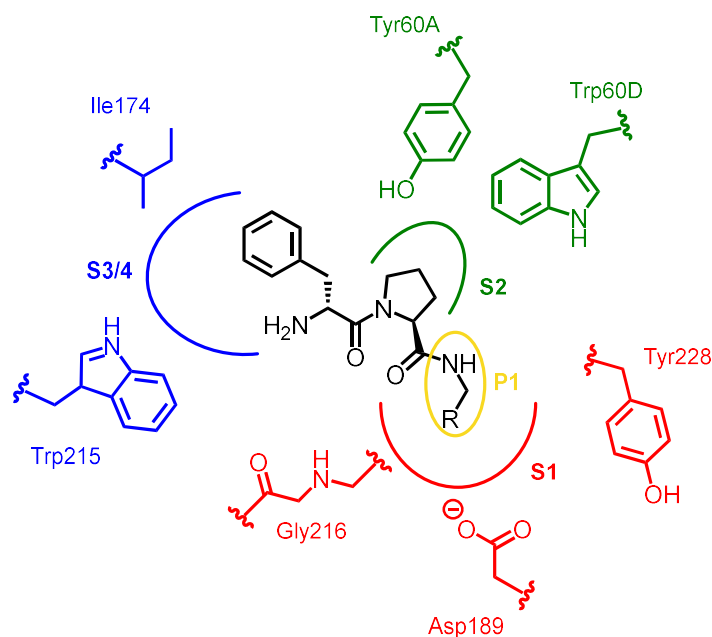


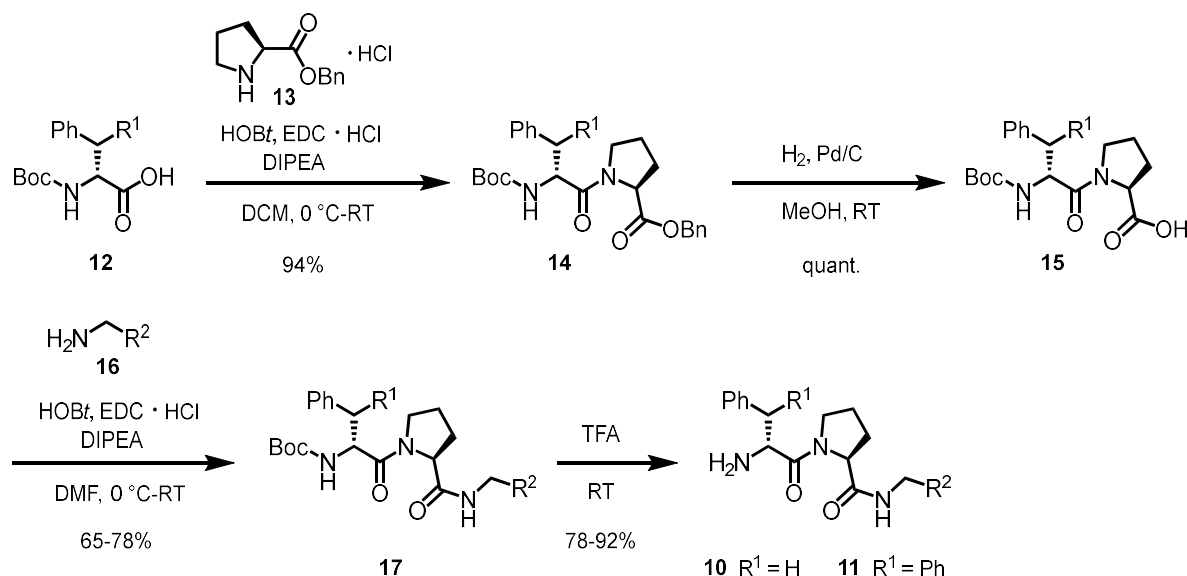
Abb. 18: Die Komplexierung des Inhibitors **10** ist in der aktiven Tasche von Thrombin dargestellt. Dabei geht der Phenylring mit der S3/S4-Tasche (blau) Wechselwirkungen ein, während der Prolinring mit der 60er-Schleife der S2-Tasche (grün) interagiert. Die Reste R beschreiben die unterschiedlichen P1-Bausteine aus Abb. 17, die Wechselwirkungen mit der Substratspezifischen S1-Tasche (rot) bilden. Die Substraterkennung erfolgt durch das Asp189 am Boden dieser Tasche.

Weiterhin sollten diverse Fragmente sowie D-Phe-Pro-Derivate kristallographisch in beiden Proteinen untersucht werden, deren Bindungseigenschaften in der S1-Tasche charakterisiert und verglichen werden sollten. Darunter gehören zum einem die Benzylamin-Derivate, die mit ihrer benzyllischen Aminogruppe durch das Asp189 erkannt werden sollten. Zum anderen sollten auch N-Amidinopiperidin-Derivate anhand von Kristallstrukturen charakterisiert werden, welche teilweise bereits in *Schiebel et al.*⁴⁷ durch Komplexstrukturen in Trypsin diskutiert wurden. Darin wurden unterschiedliche Geometrien dieser Verbindungen festgestellt, die in dieser Arbeit mit den analogen Thrombinstrukturen gegenübergestellt werden sollten.

3 Synthese

3.1 Darstellung der D-Phe/D-DiPhe-Pro-basierenden Inhibitoren 10 und 11

Die Synthese der Inhibitoren **10** und **11** erfolgte nach *Muley et al.*⁴⁸ ausgehend von Boc-D-Phe (**12a**) oder Boc-D-DiPhe (**12b**), welches mit dem Prolinbenzylester **13** und den Kupplungsreagenzien HOBt sowie EDC · HCl unter Bildung des Dipeptids **14** umgesetzt wurde. Anschließend wurde eine Hydrierung mit Wasserstoff (in Gegenwart des Katalysators Palladium auf Aktivkohle) unter Erhalt der freien Carbonsäure **15** durchgeführt, die für nachfolgende Kupplungsreaktion zur Verfügung stand. So konnte im nächsten Schritt unter den gleichen Kupplungsbedingungen wie bei der ersten Stufe das Methylamin-Derivat **16** eingeführt werden und resultiert in der Darstellung der Verbindung **17**. Schließlich wurde die Boc-Schutzgruppe mit TFA zu den gewünschten Inhibitoren **10** und **11** abgespalten (Schema 2).

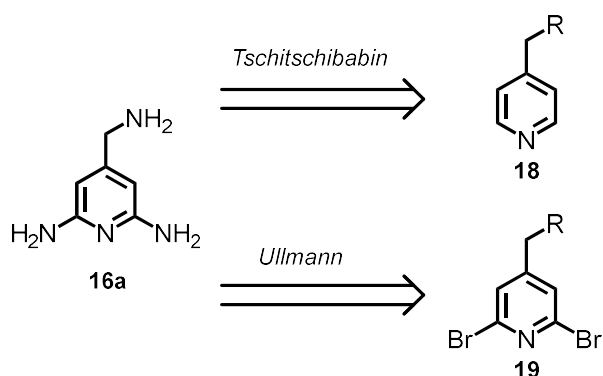


Schema 2: Vierstufige Synthese der D-Phe-Pro-basierenden Inhibitoren **10** und **11**. $\text{R}^1 = \text{H}$ (**10**, **12a**, **14a**, **15a**, **17a-c**) oder Ph (**11**, **12b**, **14b**, **15b**, **17d**), $\text{R}^2 = 2,6\text{-Diaminopyridin}$ (**16a**, **17a**), $m\text{-2-(Boc-amino)pyridin}$ (**16b**, **17b**), $p\text{-2-(Boc-amino)pyridin}$ (**16c**, **17c**) und $p\text{-N-Pyridin}$ (**16d**, **17d**).

3.2 Synthese des P1-Bausteins für Inhibitor 10a

Zur Darstellung des Inhibitors **10a** wird der P1-Baustein **16a** für die Kupplungsreaktion benötigt. Es existieren einige Publikationen zur Synthese von Aminopyridinen und entsprechender Derivate aus einer oder mehreren Aminogruppen bzw. verschiedener Positionen des Pyridin-*N*.^{49–52} Bei der gewünschten Synthese von **16a** handelt es sich um ein 2,6-Diaminopyridin, über dessen Folgechemie an den Aminogruppen oder aromatische Substitutionen bereits untersucht wurde.^{53–56} Da jedoch für **16a** in *para*-Position zum Pyridin-*N* ein Methylenamin-Rest eingeführt werden muss, wird diese Synthese zusätzlich erschwert.

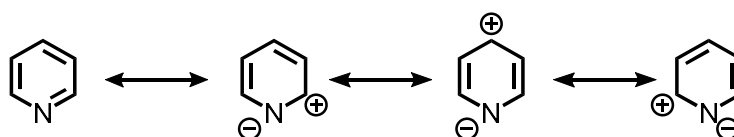
In Schema 3 werden zwei potentielle Retrosynthesen des entsprechenden Schlüsselschritts zur Einführung der Aminogruppen vorgestellt. Eine Möglichkeit wäre eine nucleophile aromatische Substitution beider Aminogruppen in 2- und 6-Position über eine *Tschitschibabin*-Reaktion des Pyridins **18**.⁵⁷ Ferner besteht auch die Option eine Diaminierung des Dibromopyridin **19** über eine Kupfer(I)-vermittelte *Ullmann*-Reaktion durchzuführen.⁵⁸ Diese Reaktion wurde u.a. in der bereits 2003 patentierten Synthese der Verbindung **16a** im Autoklaven von *Hoffmann-La Roche Inc.* angewendet, welche im Abschnitt 3.2.2 im Detail beschrieben wird.⁵⁹



Schema 3: Zwei retrosynthetische Möglichkeiten zur Darstellung von **16a**. R = Beliebiger Rest, welcher nach Einführung der symmetrisch stehenden Aminogruppen zum Amin umfunktionalisiert wird.

3.2.1 Diaminierung über eine *Tschitschibabin*-Reaktion

Bei der *Tschitschibabin*-Reaktion wird eine nukleophile aromatische Substitution durchgeführt. Theoretisch wäre zunächst eine Nitrierung über eine elektrophile aromatische Substitution anzunehmen, um die eingeführten Nitrogruppen zu den entsprechenden Aminen zu reduzieren. Doch aufgrund des elektronenarmen Aromaten, welches durch den elektronenziehenden Pyridin-*N* verursacht wird, wäre die Einführung der Nitrogruppen nur an der 3-Position bevorzugt, da dort der elektronenreichste Kohlenstoff vorliegt (Schema 4).⁶⁰



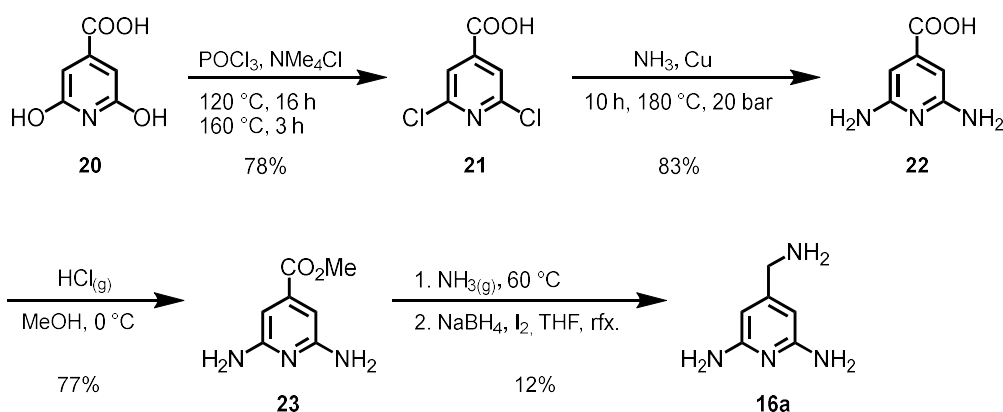
Schema 4: Mesomere Grenzstrukturen von Pyridin.

Um das symmetrische 2,6-Substitutionsmuster zu erhalten, müssten weitere Substituenten eingeführt werden, welche die Reaktion dementsprechend lenken können. Dies würde die Synthese jedoch verkomplizieren, da die neuen Substituenten wiederum entfernt werden müssten. Dementsprechend muss die Synthese über eine nukleophile aromatische Substitution ablaufen, die nach Schema 4 bevorzugt in 2-, 4- und 6-Position stattfindet.⁶⁰

Ein bereits in der Masterarbeit durchgeführter Versuch der Darstellung von **16a** über die *Tschitschibabin*-Route wurde nach der ersten Stufe abgebrochen.⁴⁶ Nach *Banerjee et al.* sollte die Einführung der Aminogruppen mit Natriumamid über eine nucleophile aromatische Substitution erfolgen und nach anschließender Versetzung mit konzentrierter Salpetersäure zur Bildung des Diaminopyridin als Nitratsalz führen.⁶¹ Da diese Stufe der Syntheseroute auch bereits unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt und weitere Parameter bezüglich der Wahl und Stöchiometrie der Reagenzien variiert wurden, galt der Fokus bei der Einführung der Aminogruppen ausschließlich der *Ullmann*-Reaktion.

3.2.2 Diaminierung über eine *Ullmann*-Reaktion

Die Synthese des gewünschten P1-Bausteins **16a** wurde bereits von *Hoffmann-La Roche Inc.* 2003 veröffentlicht und patentiert, bei welcher die Herstellung von **16a** ausgehend von Citrazinsäure (**20**) erfolgte.

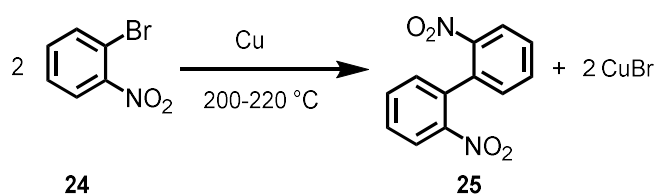


Schema 5: Patentierte Synthese von *Hoffmann-La Roche Inc.* zur Darstellung des Diaminopyridin **16a** im Autoklaven.

Zu Beginn wird Citrazinsäure (**20**) sowohl in 2- als auch in 6-Position substituiert unter Bildung des Dichloropyridins **21**. Im nächsten Schritt folgt eine Diaminierung mit konzentrierter Ammoniak-Lösung, in Gegenwart von Kupferpulver unter drastischen Bedingungen (180 °C und 20 bar), die zu Verbindung **22** führt. **23** wird in Methanol gelöst und mit Salzsäure-Gas versetzt zur Darstellung von Verbindung **23**. Anschließend wird Ammoniak-Gas im Autoklaven bei 60 °C eingeleitet und darauffolgend das Rohprodukt mit Natriumborhydrid sowie Iod zu 4-Aminomethyl-(2,6-diamino)pyridin (**16a**) reduziert.⁵⁹

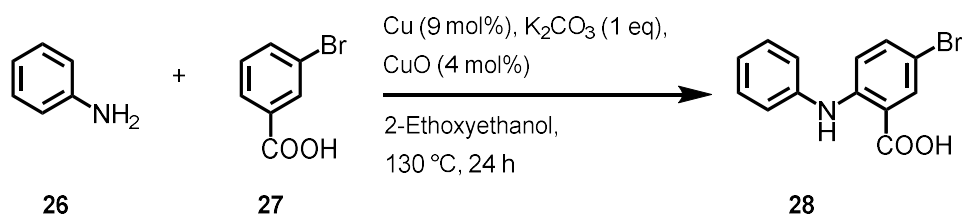
Zur Vermeidung solcher harschen Reaktionsbedingungen wird im Folgenden eine alternative Route vorgestellt, unter welcher mildere Bedingungen verwendet werden sowie auch Synthesen im kleineren Labormaßstab durchgeführt werden können. Die *Ullmann*-Reaktion soll dabei weiterhin als Schlüsselreaktion für die nukleophile aromatische Substitution der Aminogruppen in 2- und 6-Position dienen.

Bei der klassischen *Ullmann*-Reaktion findet eine Kupfer-vermittelte Kupplungsreaktion von zwei Arylhalogeniden **24** unter Bildung von Biarylen **25** statt (Schema 6).⁶²

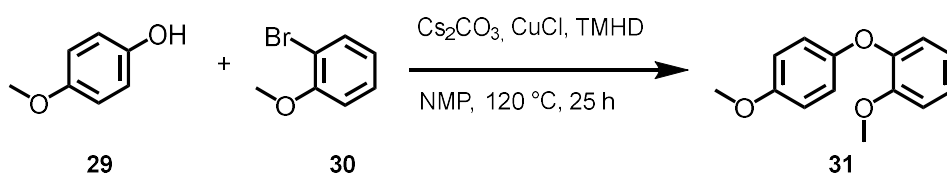


Schema 6: Cu-vermittelte *Ullmann*-Reaktion zur Darstellung von Biarylen **25**.

Die Anwendung dieser Methode erfolgte sowohl für CN-Knüpfungen mit Anilin (**26**) als auch für CO-Knüpfungen mit Phenol **29** in Gegenwart von Arylhalogeniden **27** und **30** (Schema 7 und 8).^{63,64}



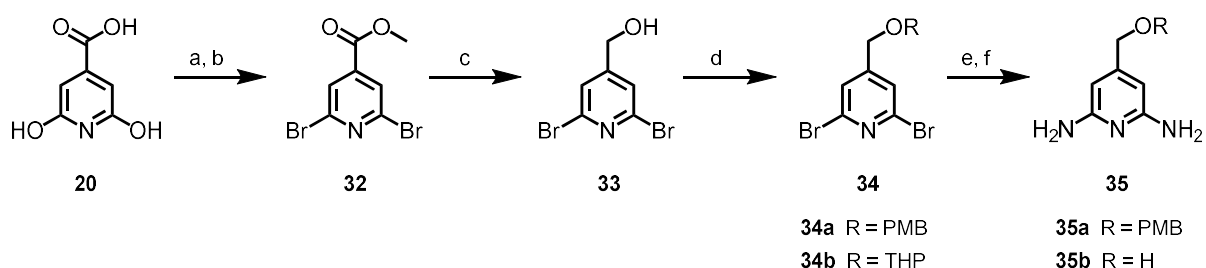
Schema 7: Kupfer-vermittelte CN-Knüpfung zur Darstellung von *N*-Arylamin **28**.



Schema 8: Kupfer-vermittelte CO-Knüpfung zur Darstellung des Ethers **31**.

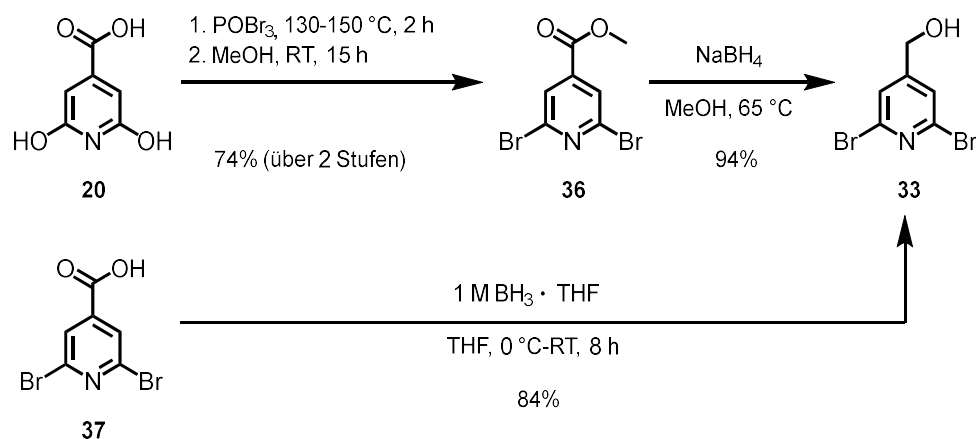
Die Bedingungen der *Ullmann*-Reaktion wurden in den letzten Jahren umfänglich optimiert, bei der diverse Ligandensysteme und weitere Additive genutzt wurden, sodass die Kupfer-katalysierten Kupplungsreaktionen unter milden Bedingungen ($< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) ablaufen können. Im Vergleich zur *Buchwald-Hartwig*-Kupplung, unter welcher auch meist Reaktionen $< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden, ist diese durch die Verwendung von Palladium-Katalysatoren entsprechend toxisch und teuer, weshalb die *Ullmann*-Reaktion die attraktivere Methode darstellt.^{65,66}

Während der Masterarbeit konnten bereits einige Stufen der Synthese von **16a** erfolgreich erzielt werden (Schema 9).⁴⁶ Dabei wurde eine Umsetzung des Diaminopyridin **35** erreicht ausgehend von Citrazinsäure (**20**) ähnlich zur patentierten Synthese von *Hoffmann-La Roche Inc.* in Schema 5.⁵⁹ Leider konnte mit Verbindung **35** die Darstellung des P1-Bausteins **16a** nicht fortgesetzt werden. Problematisch waren zum einem die Abspaltung der PMB-Schutzgruppen aus **35a** sowie die Isolierung von **35b** aus dem Reaktionsgemisch. Vermutlich lag Verbindung **35b** als HCl-Salz vor, nachdem die THP-Schutzgruppe von **34b** abgespalten wurde und war somit zu polar, um anschließend die Reaktionsprodukte aufarbeiten zu können.



Schema 9: Etablierte Zwischenstufen aus der *Masterarbeit*.⁴⁶ a) POBr_3 , $130\text{--}150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 h; b) MeOH, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ –rt, 15 h, 74% (über 2 Stufen); c) NaBH_4 , MeOH, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 h, 79%; d) **34a**: PMB Trichloroacetimidat, CSA, DCM, RT, 19 h, 77%; **34b**: DHP, PPTS, DCM, RT, 16 h, 94%; e) 25% (w/v) $\text{NH}_3(\text{aq})$, Cu_2O , DMEDA, K_2CO_3 , Ethylenglykol, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 16 h, 50–52%; f) nur **35b**: TsOH, 1 M HCl-Lsg., EtOH, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 104%.

Dementsprechend bestand die Aufgabe darin, eine Alternativroute zu finden, bei der diese Probleme nicht mehr auftreten. Es wurde folglich ein Syntheseweg gewählt, in welcher der Schlüsselschritt der Reaktion (*Ullmann*-Kupplung) am Ende stattfinden sollte, sodass die Zwischenprodukte aufgrund der Bromsubstituenten weiterhin unpolar bleiben, um damit eine Extraktion der Intermediate mit vollständiger Aufreinigung zu ermöglichen. In Schema 10 wird eine optimierte Synthese bis zum bekannten Alkohol **33** ausgehend von zwei verschiedenen Edukten vorgestellt.

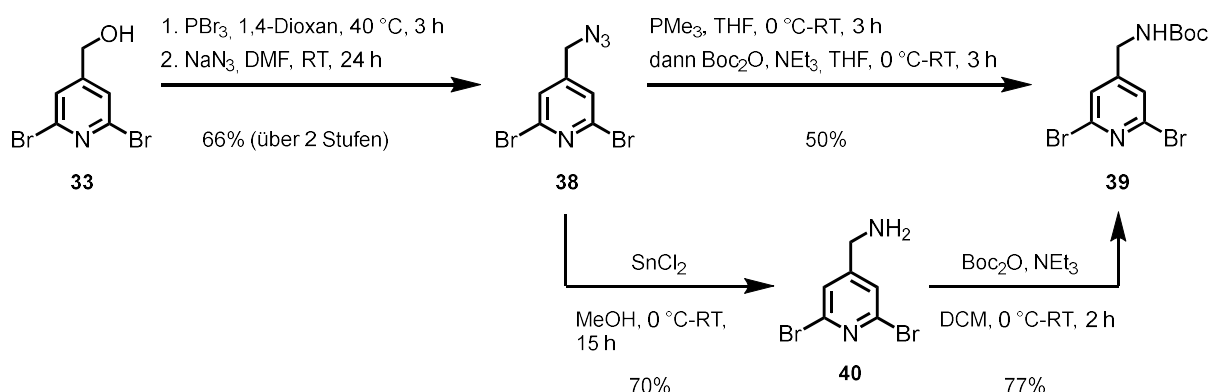


Schema 10: Halogenierung und Veresterung von Citrazinsäure (**20**) zum Ester **36** mit anschließender Reduktion zum Alkohol **33**. Alternativer Weg von Verbindung **37** über die direkte Reduktion zu **33**.

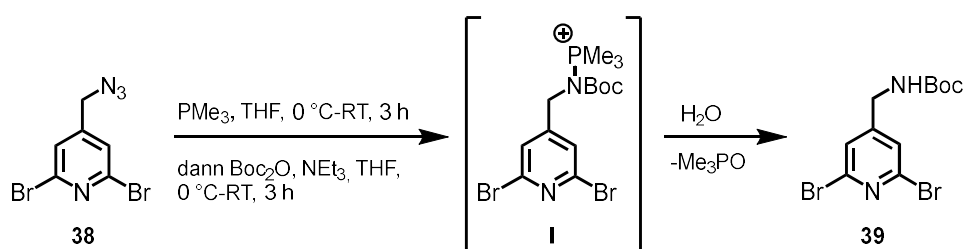
Analog zu der in der Masterarbeit etablierten Synthese aus Schema 9 kann auch die Herstellung des Alkohols **33** von der Dibromoverbindung **37** einstufig in guten Ausbeuten erhalten werden.⁶⁷ Diese Stufe stellt zwar die elegantere und auch zeitsparende Methode dar, die jedoch mit einem hohen Kostenaufwand verbunden ist. Edukt **37** ist kommerziell erhältlich (*Key Organics Ltd.*, Camelford, Cornwall, UK), aber wesentlich teurer als die Citrazinsäure (**20**). Dennoch ist diese Route definitiv zu empfehlen, weil letztendlich nur eine Stufe für **33** benötigt wird und somit sich die Kosten aufgrund der geringeren Anzahl von Stufen in Grenzen halten sowie auch die Arbeit mit Bromwasserstoff während der Reaktion vermieden wird. Vor allem ist Phosphoroxotribromid nicht sonderlich gut handhabbar und stark empfindlich gegenüber Wasser bzw. Luftfeuchtigkeit. Damit ist die Verwendung einer Boranlösung in THF die angenehmere Arbeitsmethode, unter welcher mildere Bedingungen verwendet werden, die schließlich sowohl die Aufarbeitung als auch die Aufreinigung erleichtern.

Bei der Citrazinsäure-Route ist die anschließende Reduktion des Esters **36** zum Alkohol **33** wichtig, um die Bildung einer Carbamidsäure während der *Ullmann*-Kupplung in Gegenwart von Ammoniak zu vermeiden. Nach Schema 11 wurde Alkohol **33** über *in situ*-Bildung einer Bromidverbindung in das Azid **38** überführt, welches in einer *one-pot* Synthese nach *Ariza et al.* aus einer *Staudinger*-Reaktion mit integrierter Boc-Schützung Verbindung **39** hergestellt wurde. Dabei wird nach Schema 12 ein Phosphazen erzeugt, das anschließend zum instabilen Phosphonium-Intermediat **I** Boc-geschützt wird. Nach der Hydrolyse von **I** wurde das gewünschte Produkt **39** sowie das wasserlösliche Trimethylphosphinoxid als Nebenprodukt gebildet, das in der Aufarbeitung bzw. Aufreinigung von **39** getrennt werden konnte.^{68,69} Parallel wurde testweise eine weitere Reduktion mit Zinn(II)chlorid zum Amin **40** durchgeführt, welches sich isolieren ließ und darauffolgend in einer zweiten Stufe zu **39** führte.

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Synthese



Schema 11: Konvertierung des Alkohols **33** über des Azid **38** zu **39** nach *Staudinger*-Reaktion bzw. nach Zinn-Reduktion über das Amin **40** mit anschließender Boc-Schätzung.



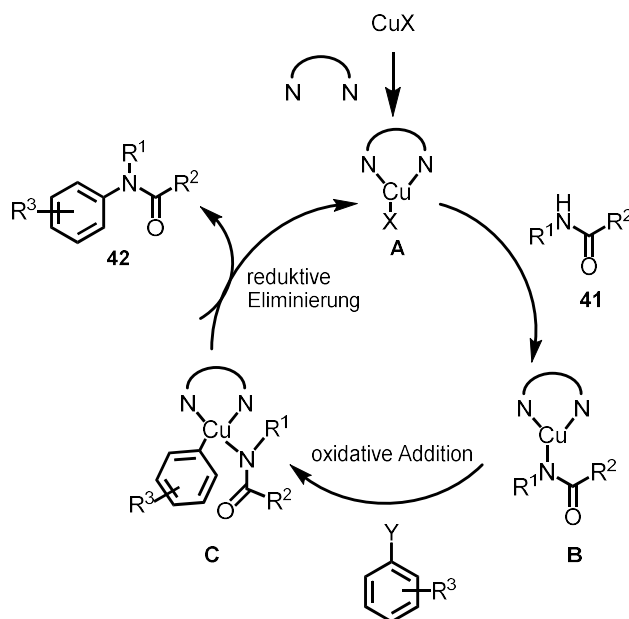
Schema 12: Schematische Darstellung der *one-pot* Synthese über eine *Staudinger*-Reaktion mit integrierter Boc-Schätzung zum Phosphonium-Intermediat I. Anschließende Hydrolyse führt zum gewünschten Produkt **39** unter Abspaltung von Trimethylphosphinoxid.^{68,69}

Die Darstellung von **39** über eine *Staudinger*-Reaktion erschien insgesamt als die vielversprechendste Route, sodass diese als fortläufiger Syntheseweg gewählt wurde. Es ist anzumerken, dass die Reduktion mit Zinn(II)chlorid für eine spätere medizinische Anwendung sowie praktischen Gründen Nachteile hat, da Zinnsalze nicht nur schwer analysierbar sind, sondern auch wesentlich toxischer sind als das für die *Staudinger*-Reaktion verwendete Kupfer(I)oxid. Zwar werden alle nachfolgenden Stufen entsprechend aufgereinigt und ggf. an der HPLC weitere Nebenprodukte entfernt, jedoch lässt sich Zinn nicht mit den uns zugänglichen Methoden detektieren und chemisch erfassen, sodass es keine Überprüfungsmöglichkeit gibt, ob Zinnsalze vollständig abgetrennt wurden. Möglicherweise können diese sogar bei der Proteinkristallisation oder auch im analytische Bindungsassays stören.

Demzufolge wurde sich auf die erfolgreiche Darstellung der Boc-geschützten Verbindung **39** aus der *Staudinger*-Reaktion für die angehende *Ullmann*-Kupplung konzentriert. Dabei ist die Schutzgruppe für **39** sehr wichtig, da diese Katalyse über Kupfer-Intermediate abläuft, bei der durch Nebenreaktionen

unerwünschte Produkte über die Koordination des freien Amins entstehen können. Die gewünschte Kupplung an den Bromsubstituenten wäre damit unterbunden und dementsprechend Verbindung **40** nicht für diese Reaktion geeignet.

Der Reaktionsmechanismus der Liganden-abhängigen *Ullmann*-Reaktion ist bisher noch nicht geklärt, aber es sind bereits verschiedene Ansätze gemacht worden wie der vergleichsweise ähnlichen *Goldberg*-Reaktion in Schema 13.⁷⁰

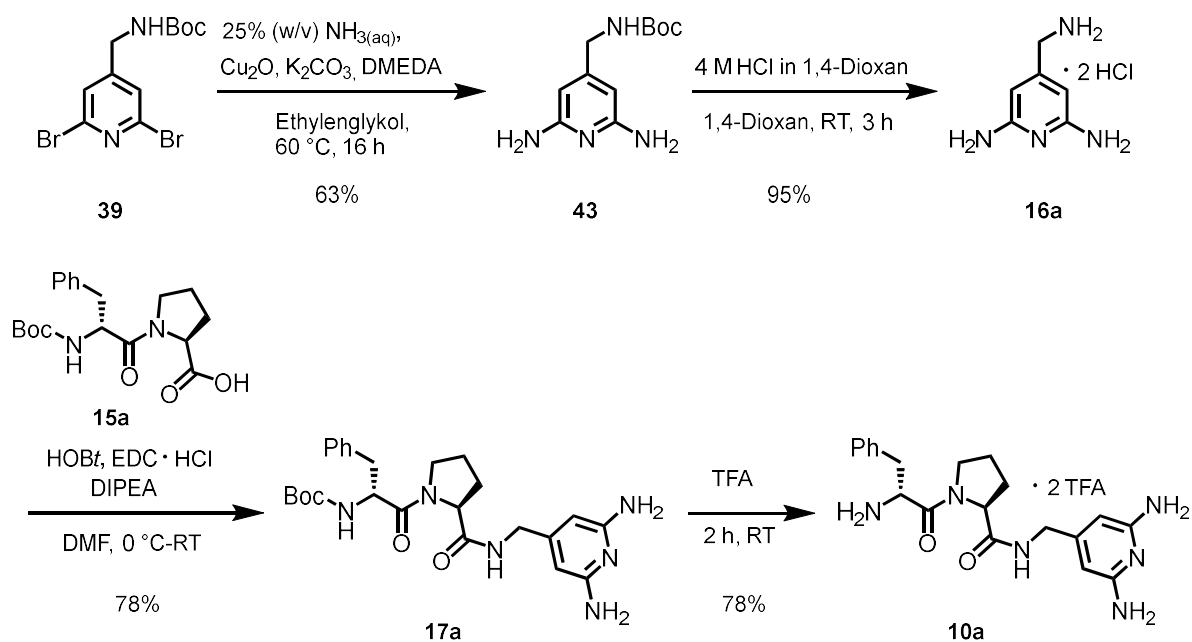


Schema 13: Cu-vermittelte Amidierung einer *Goldberg*-Reaktion. $R^{1,2,3}$ = Alkylreste, X = Gegenion des Cu-Salzes, Y = Halogen.

Cu-Intermediat **A** reagiert mit Amid **41** unter Erhalt von Intermediat **B**, das nach oxidativer Addition die Zwischenstufe **C** bildet. Die reduktive Eliminierung führt schließlich im letzten Schritt zum Kupplungsprodukt **42**.^{66,70} Wie genau dieser Mechanismus letztendlich abläuft, lässt sich nur spekulieren. Einerseits können Cu-Intermediate durch die direkte Oxidation von Cu(I) zu Cu(III) oder schrittweise Cu(I) über Cu(II) zu Cu(III) entstehen.⁶⁶ Entscheidend ist auf jeden Fall die Verwendung eines entsprechenden Liganden, der sowohl für die Stabilisierung als auch für die erhöhte Löslichkeit der Cu(I)-Spezies dient.⁷¹ Bei zweizähligen Liganden wird eine *cis*-Koordination am Kupfer blockiert, sodass ein Nucleophil in *cis*-Position auf der benachbarten Seite aus nächster Nähe miteinander reagieren können.⁷²

Nach Schema 14 wurde Verbindung **39** der Cu-vermittelten *Ullmann*-Kupplung zu **43** unterzogen. Dabei wurde nach *Elmkaddem et al.* Kupfer(I)oxid als Katalysator und DMEDA als zweizähliger Ligand eingesetzt, welche nach einem Screening das effizienteste Katalysator-Ligand-System darstellten. Ammoniak wurde hierbei als Nukleophil verwendet, das als 25%-ige wässrige Lösung eingesetzt wurde.⁵⁸ Die darauffolgende Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte unter sauren Bedingungen, die schließlich zum P1-Baustein **16a** als doppeltes HCl-Salz führte. Eine spezielle Aufreinigung wurde nicht

durchgeführt, sondern das Lösungsmittel nach vollständiger Umsetzung unter verminderten Druck entfernt und **16a** nahezu in reiner Form als HCl-Salz erhalten. Da die beiden aromatischen Aminogruppen nicht in der Lage sind nukleophil in der Peptidkupplung aufgrund ihrer geringen Reaktivität durch den elektronenziehenden Effekt des Pyridin-*N* zu agieren, reagiert ausschließlich die primäre aliphatische Aminogruppe mit Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**) zu **17a**. In der finalen Stufe wurde die entsprechende Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure zum gewünschten Inhibitor **10a** als doppeltes HCl-Salz entfernt, das anschließend über präparative HPLC aufgereinigt und in guten Ausbeuten (78%) erhalten wurde.

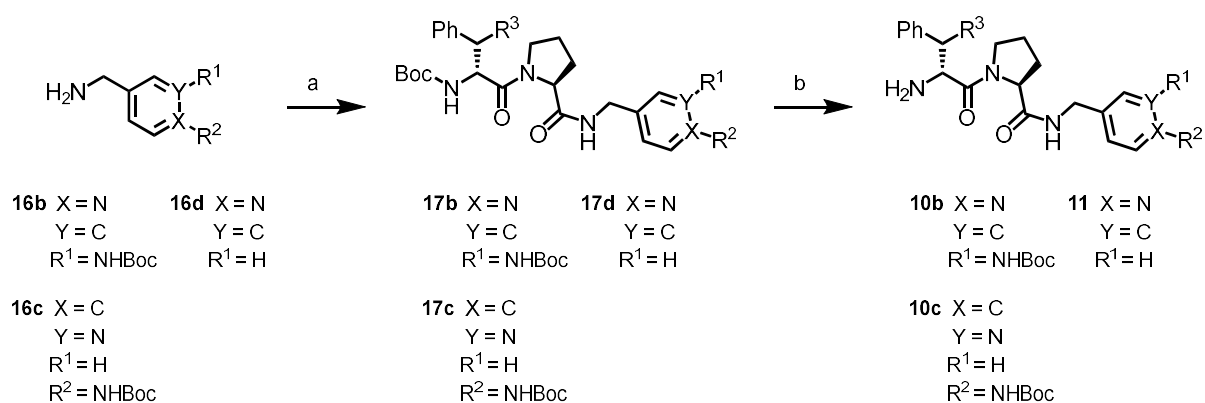


Schema 14: Dibromoverbindung **39** reagierte über vier weitere Stufen zum Inhibitor **10a**.

3.3 Synthese der Inhibitoren **10b**, **10c** und **11**

Da die P1-Bausteine **16b** und **16c** von *ChemPur* sowie **16d** von *Sigma Aldrich* kommerziell erhältlich waren, konnten diese Amine direkt für die Reaktion mit den Dipeptiden **15** (Schema 2) unter der Bildung der Kupplungsprodukte **17b-d** eingesetzt werden (Schema 15). Analog erfolgte auch die anschließende Boc-Entschützung unter Verwendung von Trifluoressigsäure zu den Inhibitoren **10b**, **10c** und **11**, die ebenfalls über präparative HPLC aufgereinigt wurden und jeweils als doppelte TFA-Salze vorlagen.

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Synthese



Schema 15: Kupplungsreaktion mit anschließender Entschützung zu den Inhibitoren **10b**, **10c** und **11**. a) Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**) für **16b** und **16c**, Boc-D-DiPhe-Pro-OH (**15b**) für **16d**, HOBt, EDC · HCl, DMF, DIPEA, 0 °C-RT, 18-24 h, 65-73%; b) TFA, RT, 2 h, 82-92%. R³ existiert nur für **11**, **16d** und **17d**. Die Ausbeuten der Inhibitoren **10b**, **10c** und **11** wurden nach der präparativen HPLC-Aufreinigung bestimmt.

4 Kristallographische Untersuchung

4.1 Allgemeines zur Proteinkristallisation

Zur Beschreibung und strukturellen Charakterisierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen anhand der Röntgenstrukturanalyse werden Proteinkristalle in Lösung gezüchtet. Dazu wird der Sättigungspunkt am Protein in der Lösung überschritten, sodass das Protein ausfallen kann. Es ist wichtig, dass dieser Prozess langsam abläuft, um Kristallisationskeime zu bilden, die miteinander wachsen können. Anhand des Phasendiagramms in Abb. 19 werden die verschiedenen Phasen zum Wachstum von Proteinkristallen erläutert. Hierbei wird zwischen einem ungesättigten und gesättigten Bereich unterschieden. An der Grenze beider Zustände liegt die maximale Löslichkeit des Proteins mit einer definierten Konzentration vor. Zusätzlich wird der gesättigte Bereich in eine metastabile und eine labile Phase unterteilt. In der metastabilen Phase werden die ersten Kristallisationskeime erhalten, aus denen noch keine Proteinkristalle entstehen können. Dieser Vorgang findet erst in der labilen Phase statt, die mit der metastabilen Phase im Gleichgewicht steht, damit die Keime langsam heranwachsen können. Schließlich wird bei Überschreitung des Sättigungspunkts ein Ungleichgewicht hergestellt und damit auch ein Zustand erreicht, in der das Protein kristallisieren kann.^{73,74}

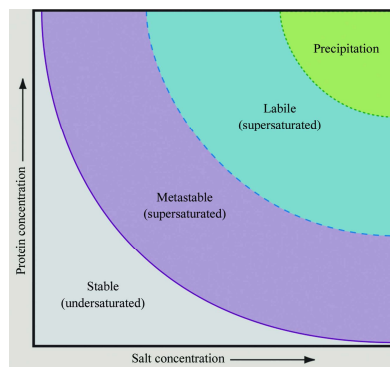


Abb. 19: Phasendiagramm zur Proteinkristallisation von McPherson und Gavira entnommen.⁷³

Proteinkristalle können nur aus einer übersättigten Lösung wachsen und nicht aus einer untersättigten Umgebung. Um eine solche Übersättigung erzielen zu können, kann zum einen die Temperatur erniedrigt werden, sodass die Löslichkeit des Proteins erniedrigt wird. Dies lässt sich auch zusätzlich durch Zugabe weiteren Präzipitaten wie PEG beeinflussen. Da Proteine u.a. geladene funktionelle Gruppen besitzen, kann durch Veränderung des pH-Wertes und der Ionenstärke die Kristallisation unterstützt werden. Durch das „Aussalzen“ wird dem Protein das Lösungsmittel entzogen und somit eine erhöhte Sättigung erreicht sowie die Kristallisation erleichtert.⁷ In der Regel wird in der Praxis die *hanging drop* oder die *sitting drop*-Methode verwendet. Erfolgt die Kristallisation über *hanging drop*, so wird im gleichen Verhältnis Protein- und Reservoirlösung auf einem Glasplättchen miteinander

vermischt und anschließend damit das Reservoir nach Abb. 20 abgedeckt. Je nach Dampfdruckunterschied geht die wässrige Phase langsam in das bzw. aus dem Reservoir über, wodurch sich eine Konzentrationsverschiebung im hängenden Tropfen durch Dampfdiffusion einstellt. Dabei wird sowohl die Proteinkonzentration als auch die Präzipitatkonzentration erhöht und folglich eine übersättigte Lösung erreicht. Analog funktioniert die Dampfdiffusion über die *sitting drop*-Methode, bei welcher der Tropfen auf einer *micro-bridge* vorgelegt wird.⁷³

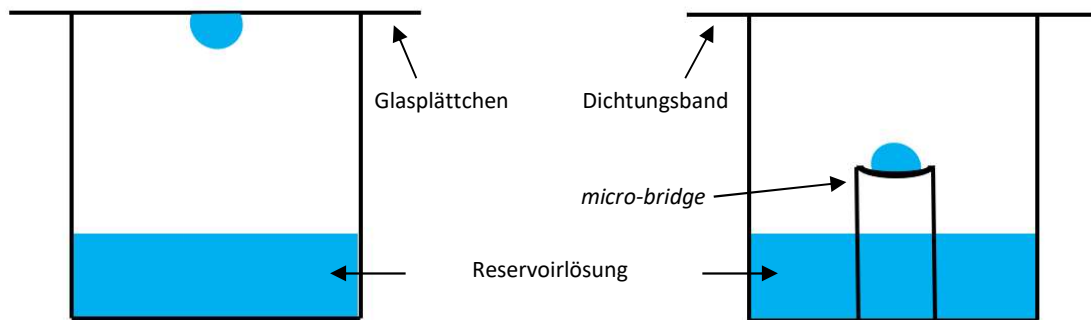


Abb. 20: Abdeckung des Wells erfolgt durch ein Glasplättchen bei der *hanging drop*-Methode (links), während bei der *sitting drop*-Methode (rechts) das Well mit einem Dichtungsband verschlossen wird.

Sobald die entstandenen Kristalle eine ausreichende Größe haben ($> 0.05 \text{ mm}$, Abb. 21), können sie mit Hilfe von Beugungsexperimenten vermessen werden. Hierbei werden Röntgenstrahlen eingesetzt, die mit ihrer kurzen Wellenlänge von ca. 1 \AA elastisch (Streuung ohne Energieverlust) mit der Probe ausüben sollen. Treffen Röntgenstrahlen auf die Elektronen eines Atoms, so werden sie mit veränderter Richtung getrennt. Die Atome im Kristall sind periodisch angeordnet und durch sie lassen Scharen paralleler Gitterebenen legen, die sich in ihren Orientierungen, in ihrem relativen Abstand und in ihrer Besetzungsdichte mit Atomen unterscheiden. Ein Detektor kann schließlich die reflektierten Strahlen auffangen unter Erhalt eines Diffraktionsbildes, aus dem sich die Intensität und die Amplitude dieser Reflektionsstrahlen bestimmen lassen. Daraus werden Differenzelektronenkarten berechnet, welche die Positionierung der jeweiligen Atome des Proteins in der Elementarzelle definieren.^{7,75,76}

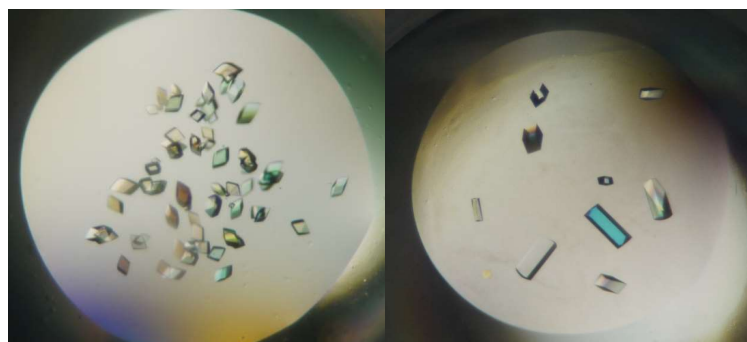


Abb. 21: Trypsinkristalle mit unterschiedlicher Raumgruppe (links: trigonal $P3_121$, rechts: orthorhombisch $P2_12_12_1$).

4.2 Kristallstrukturen der Inhibitoren 10a-c und 11

In der vorliegenden Untersuchung wurden die strukturähnlichen Serinproteasen Thrombin und Trypsin für eine Selektivitätsstudie ausgewählt. Während ersteres in der Blutgerinnungskaskade eine wichtige Rolle spielt, stellt das zweite Protein ein Verdauungsenzym dar.⁷⁷ Trotz des ähnlichen Aufbaus bezüglich ihrer S1-Taschen sind diese für die Selektivitätsunterscheidung besonders wichtig.⁷⁸ Vor allem wird der Austausch der Aminosäure Ala190 durch Ser in dieser Tasche für die Diskriminierung verantwortlich gemacht.^{27,79,80} Mit Hilfe von thermodynamischen Experimenten sollte eine Vergleichsstudie zur Selektivität beider Proteine mit einer Serie von D-Phe/D-DiPhe-Pro-(amino)pyridin-Inhibitoren **10a-c** und **11** durchgeführt werden. Dafür wurden entsprechende Kristallstrukturen zur Charakterisierung der verschiedenen Bindungsmodi angefertigt, um die Wechselwirkungen aller Inhibitoren im Komplex zusätzlich anhand von ITC-Experimenten thermodynamisch zu untersuchen. Die Thrombinstrukturen (Abb. 22A-D) wurden über die *soaking*-Methode in der kubischen Raumgruppe (C121) und die Trypsinanaloga durch Kokristallisation (Abb. 22E-H) in der orthorhombischen Raumgruppe (P2₁2₁2₁) erhalten mit einer Auflösung von 0.95-1.57 Å.

Bei Inhibitor **10a** handelt es sich bei der P1-Kopfgruppe um eine Diaminopyridin-Struktur, die mit Asp189 am Boden der S1-Tasche in Thrombin bzw. Trypsin interagiert. Die *ortho*-substituierten Aminogruppen des Pyridins gehen mit Gly219 sowie mit dem Wassermolekül W2 Wechselwirkungen ein, während der Pyridin-N über W1 eine Wasser-vermittelte Interaktion mit Asp189 ausbildet. Im Falle von Thrombin kommt es zu zusätzlichen Wechselwirkungen zwischen der „linken“ exocyclischen Aminogruppe und der Carboxylatgruppe von Glu192 sowie W3. Hierbei nimmt die Seitenkette des Glu192 eine rückgefaltete Konformation an, um über das interstitielle Wassermolekül W3 an der Bindung der P3-Gruppe teilzunehmen sowie einen Kontakt zur P2-Gruppe über W2 herzustellen. In Trypsin wird diese Wechselwirkung nicht gefunden und Glu192 wird hier durch ein entsprechendes Gln ersetzt, das in dieser Struktur fehlgeordnet vorliegt. Durch den Austausch von Ala190 zu Ser im Trypsin-Komplex interagiert die Seitenkette des Ser190 direkt mit dem Wassermolekül W2 und der "rechten" Aminogruppe. Diese Aminogruppe führt zusätzlich eine Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe des Rückgrats von Ser190 und der Carboxylatgruppe von Asp189 durch.

Die P1-Kopfgruppe des Inhibitors **10b** nimmt zwei Konformationen bei der Bindung in der S1-Tasche von Thrombin ein (Abb. 22B, 76% für I und 24% für II). Dabei ahmt Konformation I den Bindungsmodus von **10a** nach, bei welcher die Aminogruppe sich in Richtung Tyr228 orientiert und eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Wassermolekül W2 ausbildet, während in Konformation II die Aminogruppe in Richtung Gly219 zeigt. Dabei interagiert der Pyridin-N über das Wassermolekül W1 in

beiden Konformationen mit Asp189. In der Trypsinstruktur kann ein vergleichender Bindungsmodus zugeordnet werden (Abb. 22F), wobei Ligand **10b** hier jedoch nur eine Konformation in Trypsin annimmt. Ein sehr ähnliches Interaktionsmuster findet sich für **10a** und **10b** in Richtung Tyr228, wie es bereits bei Thrombin beobachtet wird, und das Wasser-vermittelte Wechselwirkungen mit der Aminogruppe und mit dem Pyridin-*N* zur Carboxylatgruppe von Asp189 und dem Wassermolekül W2 ausbilden. Im Thrombinkomplex mit Inhibitor **10b** befindet sich das Glu192 ebenfalls in einer rückgefalteten Konformation, um mit der P3-Gruppe über W3 sowie mit der P2-Gruppe über W4 zu interagieren. Bei der Trypsinstruktur fehlen solche Interaktionen und das entsprechende Gln192 nimmt keine rückgefaltete Geometrie an, um mit der P1-Kopfgruppe wechselwirken zu können. Möglicherweise ist das in Thrombin geladene Glu192 für die beobachtete Doppelkonformation der Kopfgruppe verantwortlich. Analog zum Trypsinkomplex mit Inhibitor **1** bildet Ser190 die gleichen Wechselwirkungen zu W2 und der Aminogruppe des Liganden aus, welches in Kontakt sowohl mit Asp189 als auch mit der Carbonylgruppe des Rückgrats von Ser190 steht.

Inhibitor **10c** ist ein regioisomeres Aminopyridin-Derivat von **10b**, bei dem die P1-Kopfgruppe durch die Aminogruppe *para*-substituiert ist und der Pyridin-*N* sich in *meta*-Position zum D-Phe-Pro-Gerüst befindet. Der Thrombinkomplex (Abb. 22C) zeigt eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu Asp189 und wird durch weitere Wechselwirkungen mit den Carbonyl-Sauerstoffen des Rückgrats von Ala190 sowie Gly219 ergänzt, während der Pyridin-*N* mit Wassermolekül W2 interagiert. Glu192 weist das gleiche Interaktionsmuster auf wie in den Thrombinkomplexen mit Inhibitor **10a** und **10b** unter Bildung von Wasser-vermittelten Kontakten mit der P2- bzw. P3-Gruppe über W3 sowie W4. Ein ähnlicher Bindungsmodus lässt sich auch im Trypsinkomplex (Abb. 22G) für die P1-Kopfgruppe beobachten, in dem sowohl direkte als auch Wasser-vermittelte (W1) Wechselwirkungen zu Asp189 aufgebaut werden. Ferner gibt es eine direkte Interaktion zwischen der Seitenkette von Ser190 und dem Pyridin-*N*. Durch diesen direkten Kontakt zum Ser190 wird das Wassermolekül W2 in den hinteren Bereich der Tasche verschoben, welches dennoch weiterhin mit dem Pyridin-*N* und der Hydroxygruppe von Ser190 interagiert. Die Seitenkette von Gln192 besitzt fehlgeordnete Orientierungen im Trypsinkomplex mit Inhibitor **10c** und ist dort dementsprechend nicht sichtbar. Überraschenderweise ist eine zweite Konformation (51% für I und 49% für II) für den Aromaten des an der P3-Position gebundenen Phenylalanins zu beobachten, die jedoch keinen Einfluss auf den Bindungsmodus der P1-Gruppe hat. In Abb. 22D ist Inhibitor **11** das Analogon einer Verbindung, die in einer früheren Studie bereits untersucht wurde und ein D-Diphenylalanin als P3-Gruppe besitzt, aber in Bezug auf P1 und P2 den gleichen Bindungsmodus wie das D-Monophenylalaninderivat beschreibt.⁸¹ Dabei bildet der unsubstituierte Pyridinring der P1-Kopfgruppe eine indirekte Interaktion mit Asp189, die durch zwei Wassermoleküle (W1 und W5) vermittelt wird. W1 und W5 haben jeweils eine Besetzung von 50% und weisen einen engen Abstand von 2.0 Å zueinander sowie angemessene *B*-Faktoren (23-24 Å²) auf. Ein

zusätzliches Wassermolekül (W6) befindet sich mit einem Abstand von 2.1 Å zu W1 mit einem akzeptablen *B*-Faktor (23 Å²), das ebenfalls auf eine Besetzung von 50% verfeinert wurde. Ein ähnliches ungeordnetes Wassernetzwerk zwischen dem Pyridin-*N* und Asp189 wurde zuvor anhand der bereits bestimmten Struktur des D-Phe-Pro-Analogons von Biela *et al.* beschrieben.⁸¹ Auffallend ist, dass für **11** ein sehr ähnlicher Bindungsmodus wie bei den Aminopyridin-Inhibitoren **10a** und **10b** beobachtet wird. Allerdings interagiert der Pyridin-*N* bei allen analogen Trypsinkomplexen mit Asp189 über ein einzelnes und vollständig besetztes Wassermolekül, das sich in der gleichen räumlichen Position befindet. Desweiteren weist Ser190 zwei Konformationen auf, die möglicherweise aufgrund der hochaufgelösten Struktur von 0.95 Å festzustellen sind. Während Konformation I (Besetzung von 79%) mit W2 in Kontakt steht, bildet die andere Konformation (II, Besetzung von 21%) Wasserstoffbrückenbindungen mit der Phenolgruppe des Tyr228 aus. Folglich liegt der größte Unterschied zwischen den Thrombin- und Trypsinkomplexen bei **11** vor, wobei im ersten Fall Wechselwirkungen zwischen **11** und Asp189 aus einer hochgradig ungeordneten Wasserstruktur mit mehreren nicht vollständig besetzten Wassermolekülen bestehen, während im Falle des Trypsinkomplexes die Carboxygruppe von Asp189 einen geordneten Kontakt festigt, der durch ein einziges Wassermolekül vermittelt wird.

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Kristallographische Untersuchung

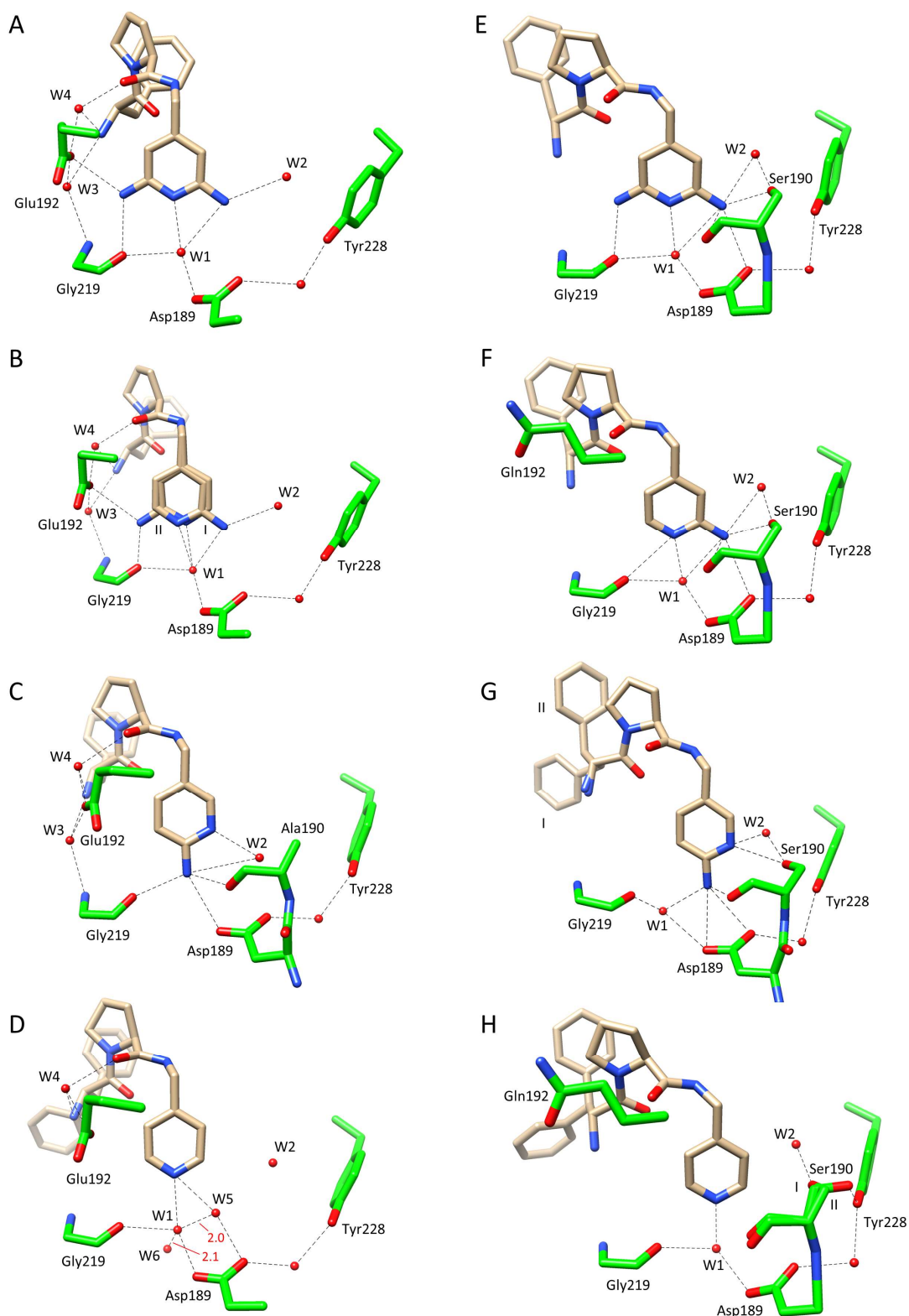


Abb. 22: Bindungsmodi der Inhibitoren **10a** (A), **10b** (B), **10c** (C) und **11** (D) in der S1-Tasche von Thrombin (links) im Vergleich zu den Strukturen von Trypsin (rechts) mit den Inhibitoren **10a** (E), **10b** (F), **10c** (G) und **11** (H). Die Inhibitoren sind in hellbraun, während die Proteinreste in grün gezeigt werden. Heteroatome sind farbkodierte Atome. Wassermoleküle sind rot und günstige Wasserstoffbrückenbindungen als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Im Thrombinkomplex D ist der entsprechende Abstand (rot) zwischen den Wassermolekülen (W1, W5, W6) in Å angegeben. In den Trypsinkomplexen E und G ist Gln192 aufgrund der nur schwach definierten $mF_o - DF_c$ -Elektronendichte der Seitenkette nach der Verfeinerung nicht sichtbar. PDB Codes sind in den kristallographischen Tabellen 8 und 10 (Abschnitt 7.1) zu finden.

4.3 Weitere Kristallstrukturen von D-Phe-Pro-Derivaten

Bei der folgenden Kristallstruktur (Abb. 23B) handelt es sich um einen weiteren Trypsinkomplex mit Inhibitor **10c**, welche in diesem Fall in der trigonalen Raumgruppe ($P3_121$) kristallisiert wurde. Dafür wurde die Verbindung **10c** in *apo*-Trypsinkristalle eindiffundiert (Abb. 21, links). Zur Herstellung solcher Kristalle in ihrer trigonalen Form wurden andere Bedingungen im Vergleich zur Kokristallisation verwendet, die im experimentellen Teil (Abschnitt 7.1) beschrieben sind.

Es lässt sich zunächst feststellen, dass **10c** unterschiedliche Bindungsmodi in beiden Raumgruppen aufweist. In der trigonalen über *soaking* erhaltenen Struktur (Abb. 23B) bildet die exocyclische Aminogruppe keine direkte Wasserstoffbrückenbindung mit Asp189 aus, sondern eine Wasser-vermittelte Wechselwirkung mit Asp189 sowie Gly219 über W1 ein und interagiert direkt mit Ser190 in einem Abstand von 3.4 Å, während dieser Kontakt in der orthorhombischen Struktur über den Pyridin-N erfolgt. Außerdem fehlt der trigonalen Komplexstruktur die Bindung der Aminogruppe zum Rückgrat des Ser190, wo hingegen der Pyridin-N in Richtung des Gly219 zeigt und nicht wie in der orthorhombischen Struktur (Abb. 23A) zum Wassermolekül W2 des Tyr228. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass der Ligand **10c** gestreckt in der Bindetasche vorliegt und keine zweite alternative Konformation der Phenylgruppe des P3-Bausteins besitzt. Dies ist aufgrund der dichter gepackten benachbarten Einheitszelle in der trigonalen Struktur zu begründen, sodass nicht genügend Raum für eine fehlgeordnete P3-Gruppe existiert. Die Aminosäuresequenz von Ser127-Ala132 deckt die Bindetasche teilweise ab und würde sich mit der P1-Gruppe überschneiden, während in der orthorhombischen Raumgruppe keine sterischen Hinderungen vorliegen. Es ist anzumerken, dass **10c** der einzig erfolgreich zu bindende Ligand in der trigonalen Form aus der D-Phe-Pro-Serie war. Alle weiteren *soaking*-Experimente schlugen fehl, da der Proteinkristall innerhalb weniger Minuten (< 5 min bei einer Ligandkonzentration von 100 mM im Ansatz) zerfiel. Dies steht möglicherweise mit einem zu geringen Raum in der Bindetasche im Zusammenhang, da dies zu sterischen Konflikte in der Packung der Proteinmoleküle im Kristallverbund führt und letztendlich die Kristalle zum Auflösen bringen. Ferner wurden geringere Ligandkonzentrationen mit kürzeren *soaking*-Zeiten ausprobiert, aus denen allerdings keine erfolgreiche Bindung weiterer Liganden in der aktiven Tasche resultierten. Leider ist nicht eindeutig erklärbar, weshalb verschiedene Geometrien des Liganden **10c** in der aktiven S1-Tasche angenommen werden. Es lässt sich vermuten, dass aufgrund der engen Bindetasche nur die Möglichkeit bestand, diesen gestreckten Bindungsmodus einzugehen und es dadurch nicht zu dem erwarteten Kontakt analog wie in der orthorhombischen Packung zwischen der Aminogruppe von **10c** und Asp189 kommt. Der günstigste Bindungsmodus aus dieser Position war die Bildung der zuvor erwähnten wassermittelten Interaktionen und der Wechselwirkung des Pyridin-N mit Gly219. Hierbei

können außerdem die unterschiedlichen Wasserkanäle zwischen trigonaler und orthorhombischer Raumgruppe eine Rolle spielen und die Diffusion der Liganden im Protein beeinflussen, die zu diesem abweichenden Bindungsmodus führen können.

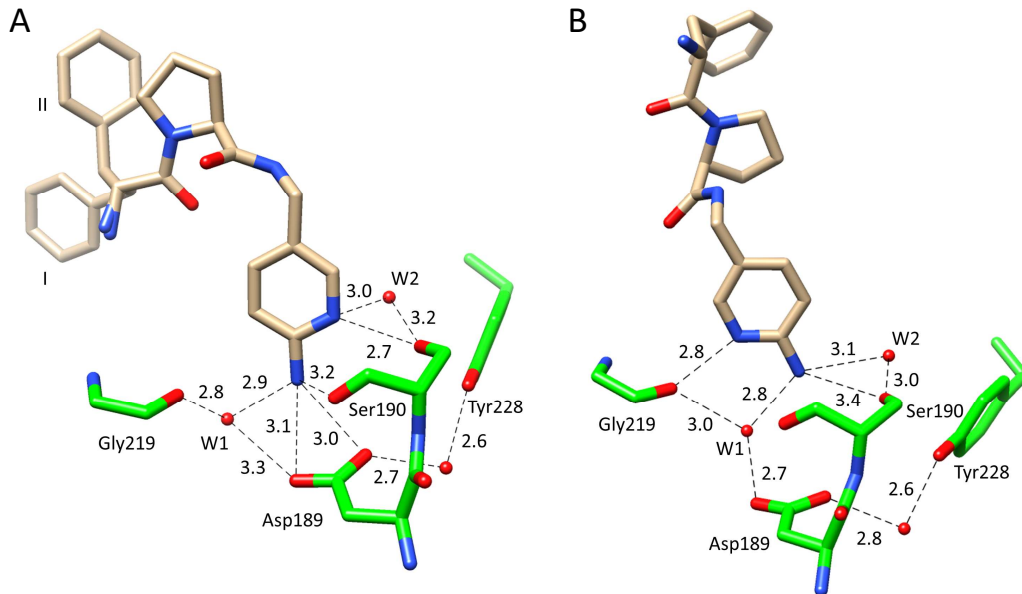


Abb. 23: Kristallstrukturen der S1-Tasche von Trypsin im Komplex mit Ligand **10c** in unterschiedlichen Raumgruppen. Der Ligand ist in hellbraun, während die Proteinreste in grün gezeigt werden. Heteroatome sind als farbkodierte Atome gezeigt. Wassermoleküle sind in rot und günstige Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarz gestrichelte Linien mit den entsprechenden Abständen in Å dargestellt. (A) Struktur in orthorhombischer Raumgruppe (P2₁2₁2₁). Die P1-Gruppe besitzt eine zweite Konformation (51% für I und 49% für II), PDB 6T5W. (B) Struktur in trigonaler Raumgruppe (P3₁21), PDB 6QL0.

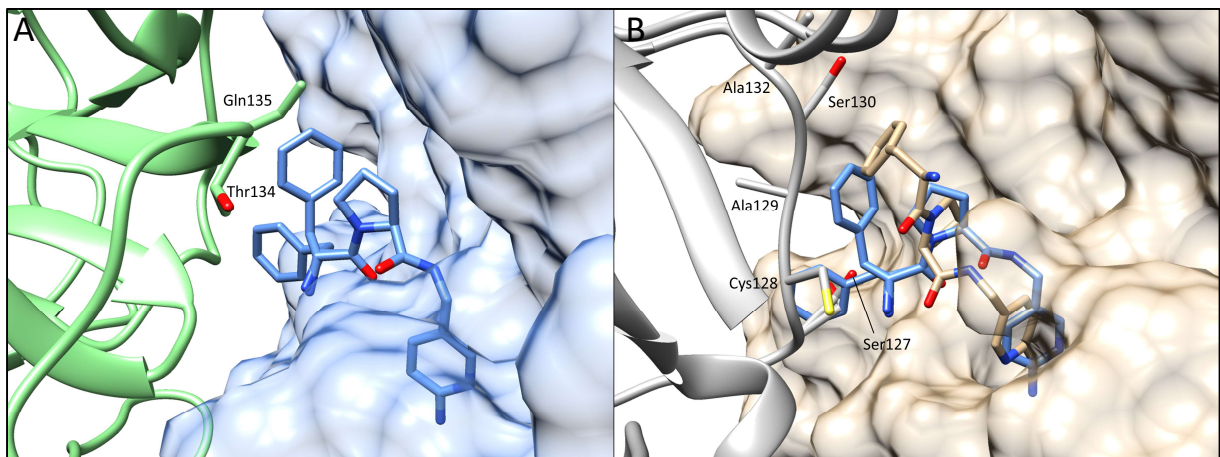


Abb. 24: (A) Orthorhombische Kristallstruktur von Inhibitor **10c** (blau). Ein Proteinmolekül in der benachbarten Einheitszelle (grüne Schleifen) ist ebenfalls dargestellt. Die Struktur wurde über Kokristallisation erhalten, PDB 6T5W. (B) Trigonale Trypsinstruktur von **10c** in hellbraun über die *soaking*-Methode erhalten, PDB 6QL0. Gleicher Ligand aus der orthorhombischen Komplexstruktur von A (blaues Stäbchenmodell) ist in der aktiven Tasche überlagert. Die Aminosäuresequenz von Ser127-Ala132 eines Proteinmoleküls in der benachbarten Einheitszelle (graue Schleifen) steht in engem Kontakt mit der Bindetasche des benachbarten Trypsins, sodass sich Ser127 (in zwei Konformationen) mit der Phenylgruppe des P3-Segments von **10c** überschneiden würde. Die Heteroatome sind als farbkodierte Atome gezeigt.

Eine interessante Beobachtung ergab sich bei einer weiteren D-Phe-Pro-Struktur in Thrombin, die in der Masterarbeit von Collins⁸² bearbeitet und in dieser vorliegenden Arbeit vollständig verfeinert wurde. In Abb. 25 und 26 wird das in der Masterarbeit synthetisierte D-Phe-Pro-*p*-Phenol-Derivat **44** von Weimer⁸³ im Komplex mit Thrombin dargestellt, welches sowohl in der S1-Tasche als auch auf der Oberfläche in einer unspezifischen Umgebung zwischen der schweren H- und leichten L-Kette bindet. Anhand der Oberflächenstruktur des Proteins ist zu erkennen, dass genügend Raum für die Bindung eines weiteren Ligandmoleküls besteht (Abb. 25).

In der S1-Tasche geht die phenolische Hydroxygruppe eine direkte Wasserstoffbrückenbindung mit Asp189 in einem Abstand von 3.2 Å bzw. eine Wasser-vermittelte Interaktion über W1 zur gleichen Aminosäure sowie zu Gly219 (Abb. 26A). In dieser Struktur nimmt Glu192 keinen Kontakt zum Liganden **44** auf und wendet sich von der aktiven Tasche ab. Im Vergleich zur zweiten Struktur von **44** bindet in einer Region des Proteins, wo keine spezifischen Wechselwirkungen gebildet werden (Abb. 26B). Es handelt sich dabei um eine Umgebung auf einer Oberfläche, welches sehr stark solvatisiert vorliegt. Während die Amidgruppen des Liganden **44** Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen aufbauen, interagiert die Hydroxyfunktion der P1-Gruppe mit einer Carbonylgruppe des Rückgrats von Pro126 mit einem Abstand von 2.6 Å. Weiterhin kann die P2-Gruppe mit ihrem Prolin-Baustein hydrophobe Kontakte mit den lipophilen Seitenketten von Ile47 und Ile242 aus der H-Kette knüpfen. Nichtsdestotrotz lässt sich in diesem Zusammenhang keine genaue Aussage machen, weshalb **44** noch ein zweites Mal an Thrombin bindet und andere D-Phe-Pro-Derivate wiederum auf dieser Oberfläche nicht vorzufinden sind. Da der Ligand **44** sich mit seiner P2- und P3-Gruppe in der S2 sowie S3/4-Tasche anpasst, ergeben sich analog zu den Thrombinstrukturen mit Inhibitor **10** und **11** Interaktionen mit Wassermolekül W4. Dadurch, dass auch sowohl die Carbonylgruppe der Amidbindung zwischen dem P1- und P2-Segment in Kontakt mit W4 steht als auch die P1-Kopfgruppe mit ihrer phenolischen Hydroxygruppe mit Asp189 sowie mit W1 wechselwirkt, wird die Konformation bzw. die Bindungspose des Liganden entsprechend bestimmt. Bei der zweiten Bindungsstelle an der Oberfläche bestehen keinerlei definierten Bereiche, wo der Ligand spezifische Kontakte knüpfen kann, sodass die gebundene Konformation des Liganden möglicherweise weniger Freiheitsgrade einfriert und hier einen weniger spezifischen Bindungsmodus eingeht. In keiner der bisherigen Studien über Thrombin-Strukturen von D-Phe-Pro-Derivaten konnte ein solcher Bindungsmodus beobachtet werden. Eine Begründung könnte sein, dass die polare Hydroxygruppe stark solvatisiert ist und dementsprechend auf der großen hydrophilen Oberfläche aus vielen Wassermolekülen sowie den polaren Aminosäuren wie Glu1C (L-Kette) und Lys235 (H-Kette) eine Position bereit besteht, dort zu binden. Möglicherweise wurden in der Masterarbeit von C. Collins hoch konzentrierte *soaking*-Lösungen von **44** für die Kristallisation verwendet, die zu dieser zweiten Bindung auf der Oberfläche führten.

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Kristallographische Untersuchung

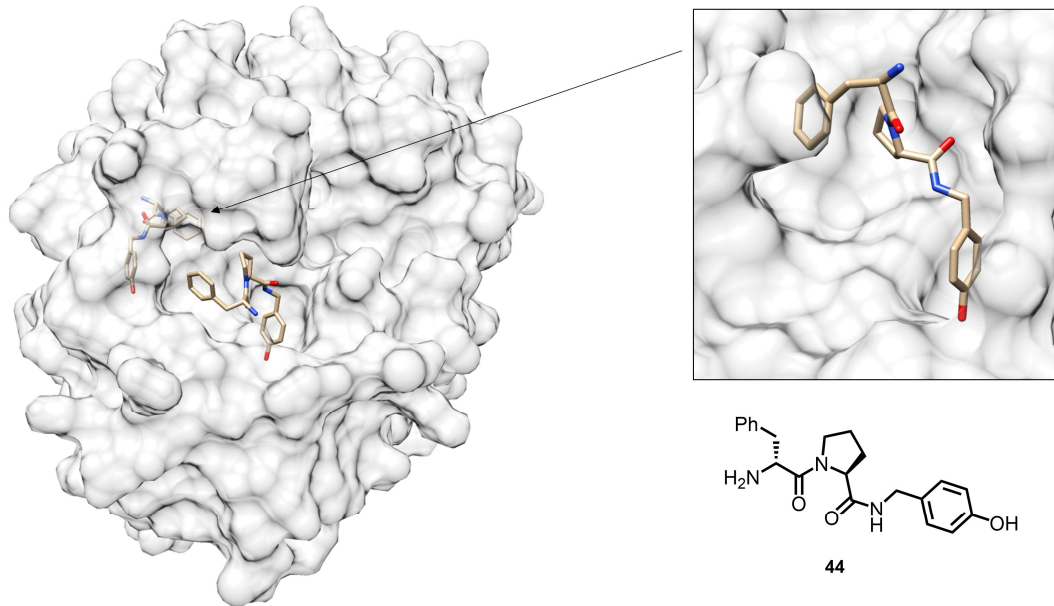


Abb. 25: Links ist die Oberflächenstruktur von Thrombin in grau mit der S1-Tasche im Vordergrund dargestellt, in der Ligand **44** (hellbraunes Stäbchenmodell mit farbkodierten Atomen) bindet. Auf der Rückseite erfolgt eine Bindung durch **44** und ist in einem Ausschnitt vergrößert abgebildet (rechts), PDB 6T3M.

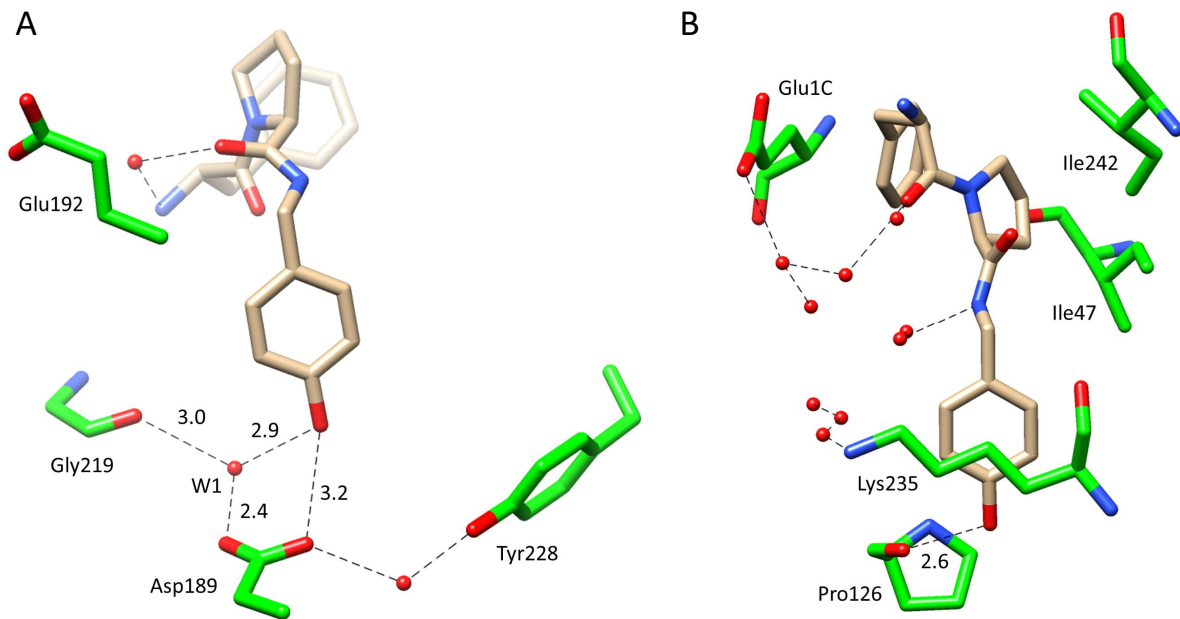


Abb. 26: Inhibitor **44** im Komplex mit Thrombin, PDB 6T3M. (A) Bindung in der S1-Tasche. (B) Zweite Bindestelle von **44** auf der hauptsächlich hydrophilen Oberfläche in der Umgebung zwischen H- und L-Kette. Der Ligand ist in hellbraun, während die Proteinreste in grün gezeigt werden. Heteroatome sind als farbkodierte Atome dargestellt. Wassermoleküle sind in rot und günstige Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarz gestrichelte Linien mit entsprechenden Abständen der P1-Kopfgruppe in Å dargestellt.

5 Thermodynamische Analyse der Inhibitoren 10a-c und 11 mit ITC

Bei der Entwicklung von Wirkstoffmolekülen mit ausreichender Selektivität achtet man auf eine sterisch günstige Passform der Liganden auf die Bindetasche sowie eine hochaffine Bindung der Liganden. Solche strukturellen und energetischen Aspekte der gegenseitigen Protein-Ligandenerkennung müssen erfolgreich berücksichtigt werden, um eine starke Bindung zu gewährleisten. Sie werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen ausgebildet, z.B. durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, hydrophobe Kontakte oder van-der-Waals-Wechselwirkungen.⁷ Die resultierende Affinität des gebildeten Komplexes wird durch die Dissoziationskonstante K_d gekennzeichnet, die sich auf thermodynamische Parameter wie die freie Gibbs-Enthalpie ΔG° , Bindungsenthalpie ΔH° und Entropie $-T\Delta S^\circ$ bezieht.³³ Außerdem sind beide Bindungspartner vor der Bildung eines Komplexes von einer Solvatationshülle aus Wassermolekülen umgeben, von denen einige im losen Kontakt mit dem Protein oder dem Liganden stehen. Wiederum bauen andere Wassermoleküle mit ihnen starke Wasserstoffbrückenbindungen auf. In allen Fällen wird sich die Bilanz an verfügbaren Freiheitsgraden der Bindungspartner mit Wassermolekülen ändern.⁸⁴ Darüber hinaus können Wassermoleküle aktiv an der Bindung teilnehmen und Kontakte zwischen Protein und Liganden vermitteln. Änderungen des Solvatationsmusters während des gesamten Assoziations- und Dissoziationsprozesses werden auch bei der Protein-Ligand-Erkennung eine wesentliche Rolle spielen und Auswirkungen auf die Affinität und insbesondere auf die Bindungskinetik haben.^{33,85,86}

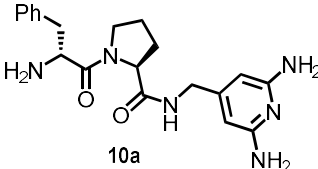
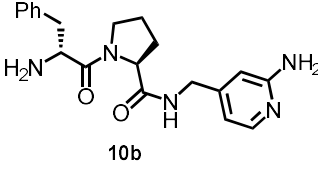
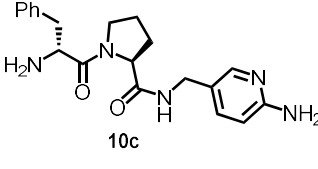
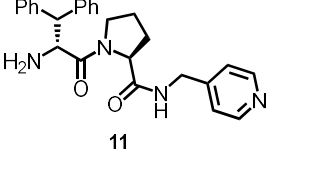
Die entsprechenden thermodynamischen Parameter lassen sich mit Hilfe von ITC-Experimenten ermitteln und sollen mit den aus Abschnitt 4.2 diskutierten Kristallstrukturen gemeinsam interpretiert werden, um die Selektivität von Thrombin und Trypsin erklären zu können. Wie bereits in der Einleitung und im Abschnitt 4.2 erwähnt, erkennen beide Proteasen durch das sich am Boden der S1-Tasche befindliche Asp189 ihre Substrate mit basischen P1-Resten. Überraschenderweise ist Thrombin hochselektiv, und kann nur P1-Arg-Substrate erkennen, während Trypsin nach P1-Arg oder P1-Lys-Resten unselektiv spaltet.^{79,87} Zwischen diesen beiden grundlegenden P1-Aminosäuren gibt es einen signifikanten Unterschied im pK_a -Wert, der jedoch stark in Abhängigkeit der lokalen Umgebung des Proteins moduliert werden kann. Beispielsweise nehmen entweder saure oder basische Ligandenkopfguppen in einer hydrophoben Tasche einen wenig wahrscheinlichen Ladungszustand an, während eine basische Ligandengruppe durch Protonierung leicht positiv geladen wird, wenn die gegenüberliegenden Reste in der Proteintasche negativ geladen sind. Das Gegenteil trifft zu, wenn der Ligand eine saure funktionelle Gruppe trägt und das Protein basische Aminosäuren wie Arg oder Lys in der Tasche besitzt.⁷ Folglich ist die Proteinumgebung so gestaltet, dass signifikante pK_a -

Verschiebungen von titrierbaren Ligandengruppen, wenn erforderlich, induziert werden. Da ITC-Experimente insbesondere die Gesamtänderungen der Protonierungszustände bei der Bindung eines Liganden im Protein bestimmen können, wurden die synthetisierten Verbindungen **10a-c** und **11** mit ihren leicht abweichenden strukturellen Aufbau ihrer basischen P1-Kopfgruppen parallel zu Thrombin und Trypsin untersucht.

5.1 ITC-Datensammlung der Inhibitoren 10a-c und 11

Für die (Amino)pyridin-Inhibitoren dieser D-Phe/D-DiPhe-Pro-Serie kann davon ausgegangen werden, dass die P1-Kopfgruppen aufgrund ihrer pK_a -Werte (Tabelle 2) nach ihre Bindung in der S1-Tasche teilweise am Pyridin-*N* protoniert vorliegen. Dies steht im Einklang mit bisherigen Studien, die signifikante pK_a -Verschiebungen der basischen P1-Kopfgruppen aufwiesen, welche mit geladenen Aminosäureseitenketten wechselwirken.³⁹ Dementsprechend wurde die gesamte Serie mittels ITC-Titrations in verschiedenen Puffern untersucht, um vermeintlich überlagerte Veränderungen in den Protonierungszuständen zu erfassen (Tabelle 3).

Tabelle 2: Inhibition von **10a-c** und **11** in Thrombin sowie Trypsin.

Inhibitor	K_i^a / nM (Thrombin)	K_i^a / μ M (Trypsin)	pK_a^b basische P1-Kopfgruppe
 10a	28 ± 1	39 ± 4	6.4
 10b	379 ± 46	62 ± 10	6.7
 10c	140 ± 15	47 ± 7	6.3
 11	1213 ± 39	497 ± 36	5.0

^a K_i -Werte wurden durch einen enzymkinetischen Fluoreszenzassay bestimmt und entsprechende Standardabweichungen wurden aus Dreifachmessungen ermittelt. ^b pK_a -Werte wurden aus potentiometrischen Titrations erhalten.

Tabelle 3: ΔH° aus direkten ITC-Titrationsen in Thrombin und Trypsin.

Inhibitor	Thrombin				Trypsin		
	$\Delta H^\circ /$	$\Delta H^\circ /$	$\Delta H^\circ /$	$\Delta H^\circ /$	$\Delta H^\circ /$	$\Delta H^\circ /$	$\Delta H^\circ /$
	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹
	Phosphat	HEPES	Tricin	Tris	HEPES	Tricin	Tris
10a	-107 ± 1.2	-87.5 ± 0.7	-80.6 ± 0.8	-64.7 ± 1.1	-39.1 ± 1.7	-30.5 ± 0.3	-17.7 ± 0.5
10b	-83.7 ± 0.5	-64.9 ± 0.1	-54.5 ± 0.5	-42.3 ± 0.2	-36.9 ± 0.9	-27.2 ± 1.8	-13.0 ± 1.0
10c	-97.6 ± 0.3	-76.7 ± 0.4	-32.0 ± 0.7	-22.9 ± 0.9	-36.8 ± 0.5	-29.5 ± 0.2	-16.4 ± 1.0
11	-30.8 ± 1.1	-26.8 ± 1.3	-24.8 ± 0.5	-24.3 ± 0.9	-	-	-
11^a	-23.2 ± 1.2	-	-	-27.1 ± 0.6	-35.7 ± 1.9	-18.5 ± 0.3	-1.0 ± 1.0

Standardabweichungen wurden aus Dreifachmessungen ermittelt. ^a ΔH° wird als beobachtete Enthalpie nach Verdrängungstitration mit Verdrängungsligand **45** (Synthese von **45** nach Muley *et al.*⁴⁸) angegeben. Dieser Kontrollversuch soll die Pufferunabhängigkeit von Inhibitor **11** in Thrombin bestätigen. Die Verdrängungstitration wurde in Phosphat- und Tris-Puffer durchgeführt, da ihre Ionisationsenthalpien die größte Differenz unter den ausgewählten Puffern aufweisen.^{88,89} Aufgrund der geringen Bindungsaffinität von **11** in Trypsin wurden die Werte durch eine Verdrängungstitration bestimmt.

Da eine ausgeprägte Pufferabhängigkeit beobachtet wurde, können wir definitiv feststellen, dass für die einzelnen Liganden Protonierungseffekte vorliegen (Abb. 27, Tabelle 4). Um die beobachteten Protonenübertragungen während der ITC-Messungen mit genau definierten Referenzwerten in wässriger Lösung in Beziehung zu setzen, wurden die pK_a -Eigenschaften der vier Liganden experimentell in wässriger Lösung bestimmt (Tabelle 4). Wie die Kristallstrukturen aus Abschnitt 4.2 und die durch Asp189 beobachteten Ordnungs- und Unordnungsphänomene andeuten, weist das unsubstituierte Derivat **11** abweichende Bindungseigenschaften auf. Aus diesem Grund wurde insbesondere dieser Ligand durch ITC-Experimente näher untersucht.

Tabelle 4 zeigt die Gesamtveränderungen des Protonierungszustandes der Inhibitoren **10a-c** und **11**, das den Austausch von Protonen während der Bindungsreaktion zwischen Ligand, Protein und Puffer beschreibt. Die gemessenen Wärmesignale wurden gegen die Ionisierungsenthalpie des jeweiligen Puffers aufgetragen und es ergab sich eine lineare Korrelation. Die Steigung der Regressionsgerade (Abb. 27) gibt die molare Menge der während des gesamten Bindungsprozesses übertragenen Protonen an. Es kann festgestellt werden, dass die Aminopyridinderivate **10a-c** 0.78-0.94 mol Protonen bei der Bindung in der S1-Tasche von Thrombin und Trypsin aufnehmen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Protonierungseffekte von **10a-c** und **11** in Thrombin und Trypsin.

Inhibitor ^a	$\Delta n_{\text{H}^+} / \text{mol}$ (Thrombin)	$\Delta n_{\text{H}^+} / \text{mol}$ (Trypsin)	$\text{pK}_{\text{a}1}^b$	$\text{pK}_{\text{a}2}^b$
10a	0.94	0.81	6.4	7.5
10b	0.95	0.90	6.7	7.5
10c	0.87	0.78	6.3	7.5
11	0.15	1.30	5.0	6.6

^aDer Protonierungszustand von allen vier Inhibitoren wurde durch direkte ITC-Titrations in beiden Proteinen bestimmt (mit Ausnahme von **11** über eine Verdrängungstiteration in Trypsin). ^bDie angegebenen pK_{a} -Werte beschreiben die Acidität der P1-Kopfgruppe ($\text{pK}_{\text{a}1}$) und die *N*-terminale P3-Gruppe ($\text{pK}_{\text{a}2}$) im jeweiligen protonierten Zustand, welche durch potentiometrische Titrations bestimmt wurden.

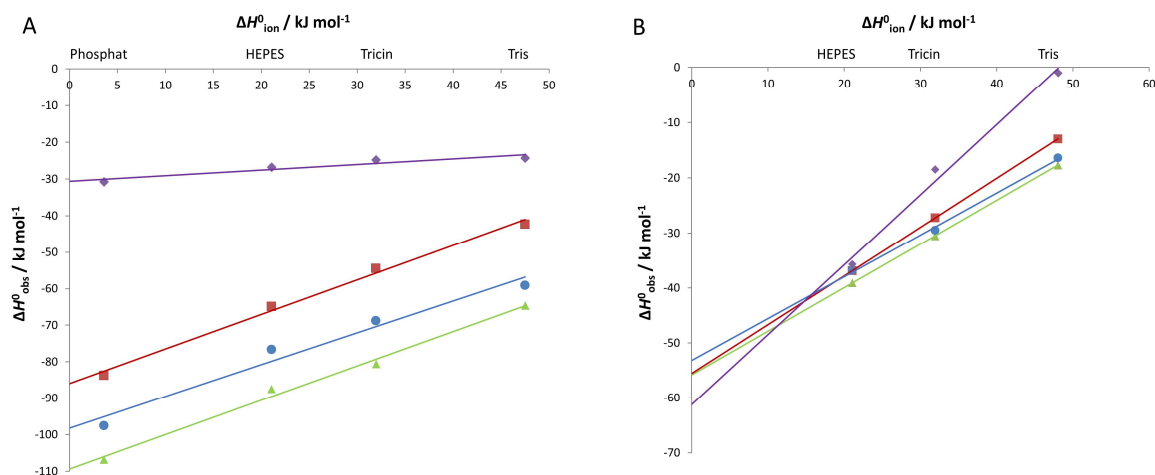


Abb. 27: Die Diagramme (A: Thrombin, B: Trypsin) zeigen die experimentell bestimmten Enthalpien $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ der Inhibitoren **10a** (grün), **10b** (rot), **10c** (blau) und **11** (lila) unter verschiedenen Pufferbedingungen. Sie werden gegen die Ionisierungsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ (Phosphat⁸⁹: 3.60 kJ mol⁻¹, HEPES⁸⁸: 21.01 kJ mol⁻¹, Tricin⁸⁸: 31.97 kJ mol⁻¹, Tris⁸⁹: 47.53 kJ mol⁻¹) der jeweiligen Puffer aufgetragen. Der Schnittpunkt dieser Diagramme wird als Puffer-korrigierter Wert angegeben (Abb. 28, Tabelle 5).

5.2 Interpretation der Protonierungseffekte

Protonierungseffekte von Inhibitoren dieser Art wurden bereits in früheren Studien eingehend erforscht.^{81,90–96} Die untersuchten D-Phe-Pro-Derivate enthielten eine P1-Benzamidingruppe, die sowohl im Puffer als auch im proteingebundenen Zustand permanent geladen sind. Zusätzlich ist die *N*-terminale P3-Gruppe teilweise im Puffer geladen und zeigt die volle Protonierung im Komplex mit Thrombin. Dabei setzt His57 in allen Komplexen 0.50-0.60 mol Protonen bei der Aufnahme eines Liganden frei. So konnte insgesamt die Protonenfreisetzung durch His57 sowie die Protonenaufnahme

durch die *N*-terminalen P3-Aminogruppen des Liganden praktisch kompensiert werden, sodass für diese Art von Liganden kein Netto-Protonierungseffekt auftritt.^{92,93} Demzufolge kann angenommen werden, dass die Änderung des Protonierungszustandes analog für die P3-Aminogruppen von **10a-c** und **11** gilt und durch die Protonenabgabe von His57 kompensiert wird.

In dieser Arbeit wurden die schwach basischen Aminopyridinderivate **10a-c** und **11** untersucht, die pK_a -Werte von 5.0-6.7 in wässriger Lösung für ihre P1-Gruppen besitzen. Gemäß der *Henderson-Hasselbalch*-Gleichung werden alle vier Inhibitoren **10a-c** und **11** unter den angewandten Pufferbedingungen bei einem pH = 7.8 vor der Proteinbindung weitgehend deprotoniert (ca. 5-10% können im Puffer protoniert sein). Basierend auf den in Tabelle 4 aufgeführten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Liganden bei der Bindung eine pK_a -Verschiebung erfahren, die durch die räumliche Nachbarschaft zum negativ geladenen Asp189 verstärkt wird. Dies führt zu einer vollständigen Protonierung des Pyridin-*N* in **10a-c** für Thrombin und Trypsin. Offensichtlich verhält sich das unsubstituierte Pyridin-Derivat **11** unterschiedlich zu den Aminopyridin-Derivaten **10a-c** und zeigt diese Protonierung nur bei Trypsin (Tabelle 4, Abb. 27). *Schiebel et al.* konnten die vollständige Protonierung von Anilin in Trypsin, trotz seines relativ niedrigen pK_a von 4.0, durch eine Neutronenbeugungsstudie nachweisen.³⁹ Es ist ersichtlich, dass Asp189 einen sehr starken Einfluss auf den Protonierungszustand des gebundenen Liganden hat und seine Umgebung wahrscheinlich so stark polarisiert, dass eine pK_a -Verschiebung von mehreren Größenordnungen induziert wird, die eine vollständige Protonierung des Anilins auslöst.³⁹ Dieses Ergebnis rechtfertigt die Aussage, dass die Inhibitoren **10a-c** 0.78-0.94 mol Protonen bei der Bindung in beiden Serinproteasen neben des gegenseitigen Kompensationseffekts der terminalen Aminofunktion (pK_a = 7.5 für **10a-c**), welche bei der Bindung die 0.50-0.60 mol freigesetzten Protonen von His57 aufnehmen.

Überraschenderweise zeigt die Bindung von Inhibitor **11** abweichende Protonierungszustände für beide Enzyme. Obwohl beide Komplexe nahezu identische Bindungspositionen in der S1-Tasche annehmen, bindet das unsubstituierte Pyridinderivat **11** erwartungsgemäß im protonierten Zustand an seinem Pyridin-*N* an Trypsin. Da der Pyridin-*N* in **11** weniger basisch ist (pK_a = 5.0) als die Kopfgruppen von **10a-c** (pK_a = 6.3-6.7), muss eine etwas größere molare Menge an Protonen übertragen werden. Aufgrund der geringen Affinität des D-Phe-Pro-Analogons (K_i = 64 μ M) aus einer früheren Studie von *Biela et al.*⁸¹ wurde eine zweite Phenylgruppe für den Liganden **11** in der P3-Position eingeführt, sodass auch der pK_a -Wert der *N*-terminalen Aminogruppe im Vergleich zu **10a-c** leicht verschoben ist und somit zu einem leicht veränderten Protonierungseffekt führen kann. Der Protonierungseffekt von **11** konnte nur für Thrombin analog zu **10a-c** in einer direkten ITC-Titration bestimmt werden, während diese Methode aufgrund der schwachen Affinität von **11** (Tabelle 2) gegenüber Trypsin so nicht durchgeführt werden konnte. Stattdessen musste eine Verdrängungstitration für **11** in drei verschiedenen Puffern erfolgen, um die Änderungen des

Protonierungszustandes zu verfolgen. Möglicherweise erhöht der Umweg über die Verdrängungstitrationen die abgeschätzte Ungenauigkeit dieses Experiments aufgrund der Fehlerfortpflanzung. Nichtsdestotrotz deutet der ermittelte Wert von 1.30 mol Protonen auf eine vollständige Protonierung der Pyridin-*N*-Kopfgruppe von **11** in Trypsin hin.

Unerwartet ergibt Inhibitor **11** bei der Bindung in Thrombin einen unterschiedlichen Protonierungseffekt (Tabelle 4). In einer früheren Studie von *Biela et al.*⁸¹ wurde der analoge D-Phe-Pro-Ligand untersucht, das keinen offensichtlichen strukturellen Einfluss auf die Bindungspose in der S1-Tasche zeigte, sodass der Bindungsmodus sowie der Protonierungseffekt des Derivats **11** direkt mit den Aminopyridin-Derivaten **10a-c** verglichen werden können. Hierbei muss erwähnt werden, dass eine geringe Differenz aus dem leicht verschobenen pK_a -Wert des D-DiPhe-Pro-Derivats **11** durchaus resultieren kann. In der hier vorliegenden Studie wurde eine Übertragung von 0.15 mol Protonen bei der Bindung des Liganden **11** an Thrombin festgestellt, die für keine Protonierung an der Pyridin-*N*-Kopfgruppe spricht, da der beobachtete Effekt nahe an die experimentellen Genauigkeitsgrenze fällt. Diese Beobachtung stimmt mit den Daten von *Biela et al.*⁸¹ überein, die auch keine Protonierung der P1-Pyridinkopfgruppe an ihrem D-Phe-Pro-Analogon über eine Verdrängungstitration ermitteln konnten. Nach einem ähnlichen Protokoll von *Biela et al.*⁸¹ wurde der stark bindende Ligand **45** für die Verdrängungstitration von **11** (Tabelle 3) in einem Kontrollexperiment verwendet, in der ebenfalls keine Änderung des Protonierungszustandes nachzuweisen war ($\Delta n_{H^+} = -0.09$ mol).

5.3 Vergleich der thermodynamischen Bindungsprofile

Im Folgenden werden die Puffer-korrigierten Werte, die sich aus einer linearen Extrapolation bei hypothetischen Pufferbedingungen mit einer Ionisierungsenthalpie von Null ergeben (Abb. 28 und Tabelle 5), diskutiert. Basierend auf den ITC-Daten wurden K_d -Werte ermittelt, die innerhalb von 3σ mit den K_i -Werten aus dem enzymkinetischen Assay übereinstimmen (Tabellen 2 und 5). Abgesehen davon, dass sehr unterschiedliche Signale ausgewertet werden, um die biologische Aktivität zu erhalten, ist die Bedeutung von K_d als ITC-Dissoziationskonstante und K_i als Inhibitionskonstante aus einem enzymkinetischen Assay nicht identisch.

Tabelle 5: Puffer-korrigierte ΔH° , ΔG° ^a und $-T\Delta S^\circ$ ^b-Beiträge aus direkten ITC-Titrationsen in Thrombin und Trypsin.

Inhibitor	Thrombin				Trypsin			
	$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta G^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$-T\Delta S^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$K_d /$ nM	$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta G^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$-T\Delta S^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$K_d /$ μM
10a	-109.4	-39.8	69.6	100	-56.2	-23.8	32.4	68
10b	-86.0	-34.4	51.6	916	-56.1	-25.3	30.8	38
10c	-98.2	-36.5	61.7	400	-53.6	-24.9	28.7	43
11	-30.6	-29.4	1.2	3681	-61.9 ^c	-17.7 ^c	44.3 ^c	757 ^c

^a ΔG° wird als Mittelwert aus den Ergebnissen der Titrationsen in verschiedenen Puffersystemen (Phosphat, HEPES, Tricin und Tris; für Trypsin keinen Phosphat-Puffer verwendet) angegeben. ^b $-T\Delta S^\circ$ wurde als Differenz aus ΔG° und den Puffer-korrigierten ΔH° -Werten berechnet. ^cDiese Werte wurden aus Verdrängungstitrationen bestimmt.

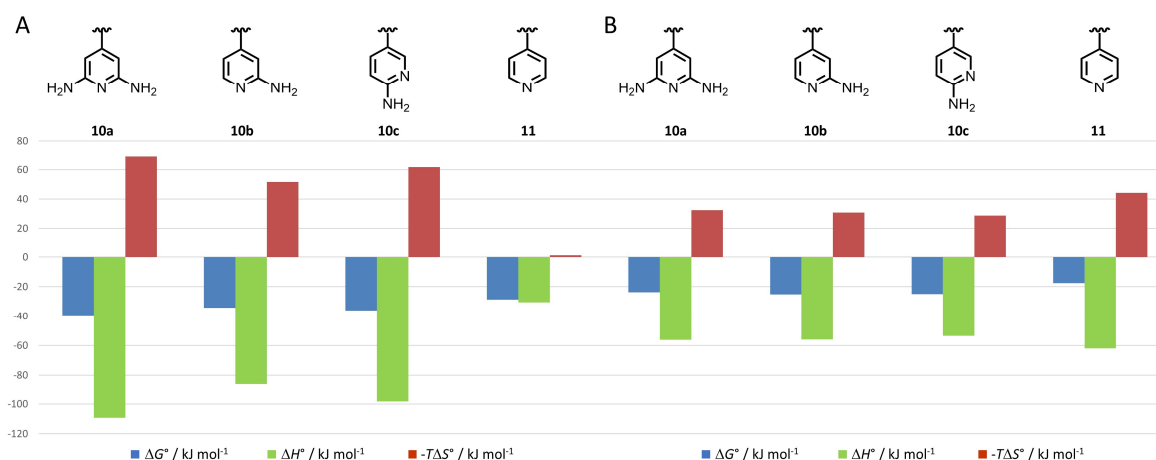


Abb. 28: Thermodynamische Signaturen der Inhibitoren **10a-c** und **11** im Komplex mit Thrombin (A) und Trypsin (B). Die Ergebnisse präsentieren die Puffer-korrigierten Werte aus Tabelle 5. Sie wurden für Thrombin aus direkten ITC-Titrationsen bestimmt, während die Werte für Trypsin aus Verdrängungstitrationen erhalten wurden.

Die Aminopyridin-Inhibitoren **10a-c** zeigen ähnliche Signaturen in ihren thermodynamischen Profilen gegenüber Thrombin. Die freie *Gibbs*-Enthalpie ΔG° aller Liganden liegt in einem Bereich von -34 bis -40 kJ mol⁻¹, die sich aus einem enthalpisch bevorzugten Bindungsprofil ergibt. Dies lässt sich durch die ladungsunterstützten Wechselwirkungen mit Asp189 erklären, welche durch interstitielle Wassermoleküle vermittelt werden. Weitere Wechselwirkungen werden durch die Aminogruppen von

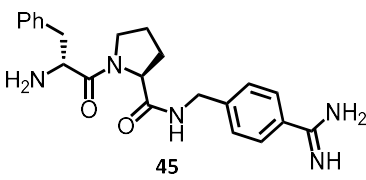
10a mit Gly219 und Wasser-vermittelt mit Glu192 gebildet. Darüber hinaus werden Kontakte zu den Wassermolekülen W1 und W2 gefunden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Wechselwirkungen zu einer sehr starken enthalpischen Signatur ($\Delta H^\circ = -109.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) von **10a** führen. Ebenfalls beschreiben die anderen Aminopyridin-Derivate einen stark enthalpischen Bindungsmodus ($\Delta H^\circ = -86.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ für **10b** und $\Delta H^\circ = -98.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ für **10c**), die jeweils nur eine einzige Aminogruppe für Wechselwirkungen nutzen können. Insgesamt stellen die Liganden **10a-c** die bisher enthalpischsten Binder aus der tripeptidischen Serie dar. Die stärkere enthalpische Signatur im Vergleich zum aus Abschnitt 5.2 beschriebenen analogen Benzamidin-Derivat resultiert aus der enthalpisch kostengünstigeren Desolvatation der P1-Kopfgruppen **10a-c**, die vor der Proteinbindung in Lösung ungeladen sind und erst in der Bindetasche geladen werden. Dies ist definitiv ein wünschenswertes Szenario, da für die Wirkstoffentwicklung enthalpisch bindende Liganden favorisiert werden⁹⁷ und die Änderung des Protonierungszustands an der Proteinbindestelle dabei hilft, Moleküle mit verbesserter Bioverfügbarkeit herzustellen, da geladene Spezies ungünstige pharmakologische Eigenschaften aufweisen. Die große enthalpische Signatur wird durch einen ungünstigen entropischen Beitrag kompensiert. Die Liganden **10a** und **10c** sind durch eine Differenz von $-T\Delta\Delta S^\circ_{10a \rightarrow 10c} = -7.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ getrennt, während sich **10b** in der Entropie noch stärker unterscheidet ($-T\Delta\Delta S^\circ_{10b \rightarrow 10a} = -18.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $-T\Delta\Delta S^\circ_{10b \rightarrow 10c} = -10.1 \text{ kJ mol}^{-1}$). Sein leicht erhöhter entropischer Vorteil gegenüber **10a** und **10c** ergibt sich aus der Tatsache, dass **10b** in der Lage ist sich in zwei alternative Konformationen in der Bindetasche zu orientieren (Abb. 22B, Abschnitt 4.2), was in Bezug auf die Bilanz der Freiheitsgrade im Vergleich zum gelösten Zustand vor der Komplexbildung entropisch vorteilhaft ist.

Das unsubstituierte Pyridinderivat **11** zeigt eine deutlich schwächere Affinität in beiden Proteinen im Vergleich zu den Aminopyridin-Derivaten **10a-c**. Um direkte ITC-Titrations zu ermöglichen wurde das analoge D-Diphenylderivat mit einer um den Faktor 10 erhöhten Affinität ausgewählt.⁹³ Insgesamt bindet **11** aufgrund der fehlenden Aminogruppe im P1-Baustein mit einem reduzierten Enthalpiebeitrag, sodass kein ladungsunterstützter Kontakt mit Asp189 hergestellt werden kann. Stattdessen ist die Carboxylatgruppe des Asp189 über ein Netzwerk von ungeordneten Wassermolekülen solvatisiert, das wahrscheinlich zu einer entropisch bevorzugten Bindungssignatur beiträgt (Abb. 22A, Abschnitt 4.2; Abb. 28A).

Ein Vergleich zwischen den Thrombin- und Trypsin-Ergebnissen zeigt, dass die Bindungsaffinität für **10a** ($\Delta\Delta G^\circ_{\text{Thrombin} \rightarrow \text{Trypsin}} = -16.0 \text{ kJ mol}^{-1}$), **10b** ($\Delta\Delta G^\circ_{\text{Thrombin} \rightarrow \text{Trypsin}} = -9.1 \text{ kJ mol}^{-1}$) oder **10c** ($\Delta\Delta G^\circ_{\text{Thrombin} \rightarrow \text{Trypsin}} = -11.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) erstaunlich gegenüber Trypsin abnimmt, obwohl dort sehr ähnliche Wechselwirkungen in der S1-Tasche festgestellt werden (Abb. 22E-H, Abschnitt 4.2). Die reduzierte Bindungsaffinität liegt im zweistelligen mikro-molaren Bereich und machte in diesen Fällen Verdrängungstitrationen notwendig (Tabellen 2 und 6).^{35,36} Da die S1-Taschen für beide Proteine sehr ähnlich sind, können die S2- und S3/4-Taschen eine wichtige Rolle spielen, um eine stärkere Affinität

zu erlangen. Thrombin ist fähig über seine 60er-Schleife starke hydrophobe Kontakte mit der P2-Prolin-Einheit auszubilden, während die P3-Gruppe in der S3/4-Tasche auch durch hydrophobe Wechselwirkungen gut eingebunden wird.⁹⁸ Ferner zeigen die Thrombinkomplexe, dass Glu192 eine rückgefaltete Geometrie annimmt, welche die Amidgruppen des D-Phe-Pro-Gerüsts stabilisiert und polare Kontakte zur P1-Kopfgruppe ausbildet (Abb. 22A-D, Abschnitt 4.2). In Trypsin wird Glu192 durch Gln ersetzt, das keinen ladungsunterstützten Kontakt bilden kann. Dies trägt zu einem geringeren Enthalpiebeitrag in Trypsin bei, was Auswirkungen auf die reduzierte Bindungsaffinität hat. Aufgrund der stärkeren gerichteten Wechselwirkungen mit Thrombin führen die Liganden **10a-c** und **11** höchstwahrscheinlich auch zu einem Verlust von Freiheitsgraden, da sie stärker an Thrombin gebunden werden. Folglich ist der entropisch vorteilhaftere Bindungsbeitrag von **10a-c** in Trypsin festzustellen. Ligand **11** zeigt ein unterschiedliches Verhalten, da er mit einer geladenen P1-Kopfgruppe bindet und so den enthalpischen Beitrag verbessert. Das in Thrombin ungeordnete Wassernetzwerk ist in Trypsin im Vergleich zu Thrombin geordnet, sodass ein fixiertes Wassermolekül zur Vermittlung des Kontakts zu Asp189 verwendet wird und dementsprechend zu einem weniger günstigen entropischen Beitrag führt.

Tabelle 6: ΔH° , ΔG° und $-T\Delta S^\circ$ -Beiträge aus ITC-Verdrängungstitrationen in Trypsin.

Methode	Inhibitor	ΔH° / kJ mol ⁻¹	ΔG° / kJ mol ⁻¹	$-T\Delta S^\circ$ / kJ mol ⁻¹	K_d / μ M
Verdrängungs- titration	10a	-21.1 \pm 0.2	-23.5 \pm 0.4	-2.1 \pm 0.6	88 \pm 28
	10b	-18.5 \pm 0.3	-24.2 \pm 0.5	-5.7 \pm 0.2	70 \pm 22
	10c	-21.5 \pm 1.0	-23.6 \pm 0.8	-2.1 \pm 1.7	64 \pm 27
		-35.1 \pm 0.5	-43.4 \pm 0.7	-8.3 \pm 1.2	0.026 \pm 0.006

Verdrängungsligand **45** wurde nach einer Vorschrift von Muley *et al.*⁴⁸ hergestellt und thermodynamische Daten über eine direkte ITC-Titration in Tris-Puffer erhalten. Die Werte für die Inhibitoren **10a-c** wurden über Verdrängungstitrationen im gleichen Puffer ermittelt. Standardabweichungen wurden aus Dreifachmessungen erhalten. $^a-T\Delta S^\circ$ wurde als Differenz aus ΔG° und ΔH° berechnet.

5.4 Zusammenhang zwischen den Protonierungseffekten und Kristallstrukturen von 10a-c und 11

In einer Neutronenbeugungsstudie von *Schiebel et al.* wurde in Trypsin beobachtet, dass Asp189 starke pK_a -Verschiebungen an den angrenzenden funktionellen Gruppen des Liganden bei der Bindung in der S1-Tasche hervorrufen kann.³⁹ Die Liganden **10a-c** erfahren in dieser vorliegenden Arbeit eine Veränderung ihrer Protonierung entweder in Thrombin oder in Trypsin, was zu einer ladungsvermittelten Interaktion führt, die über W1 erfolgt (Abb. 22A-C, Abb. 22E-G). Darüber hinaus wird die Änderung des Protonierungszustands durch mesomere Effekte stabilisiert, die von den benachbarten Aminogruppen unterstützt werden, um die positive Ladung zu delokalisieren. Die für Inhibitor **11** aufgezeichneten ITC-Ergebnisse zeigen, dass dieser Ligand mit seiner P1-Kopfgruppe am Pyridin-*N* unprotoniert in Thrombin vorliegt, aber erstaunlicherweise wird dieser in Trypsin protoniert. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in dem gebildeten fehlgeordneten Wassernetzwerk zwischen der P1-Kopfgruppe und Asp189 wider. Es lässt sich annehmen, dass das lokale Umfeld von Asp189 und die damit verbundene Elektronenverteilung eine Erklärung für diese Unterschiede liefert. Insgesamt werden drei Unterschiede zwischen den S1-Taschen von Trypsin und Thrombin beobachtet. Zunächst existiert ein Austausch von Ala190 zu Ser zwischen Thrombin und Trypsin, der jedoch in den aktuellen Fällen keinen Einfluss auf die Bindungspositionen hat. Zweitens führt der Glu192Gln-Austausch in Trypsin dazu, dass in den untersuchten Komplexen keine rückgefaltete Geometrie dieser Aminosäure wie in Thrombin eingenommen wird. Die geladene Carboxylatgruppe des Glu192 bringt sich in die Umgebung der P1-Kopfgruppe, um weitere enthalpisch günstige Wechselwirkungen in Thrombin hervorzurufen, was mit Gln192 in Trypsin nicht möglich ist. Schließlich ist der größte Unterschied zwischen den beiden Serinproteasen die Anwesenheit eines Natriumions in Thrombin, das 5.3 Å von Asp189 entfernt ist. Es zeigt eine oktaedrische Koordinationsgeometrie, die aus vier Wassermolekülen und dem Rückgrat der Carbonylgruppen von Arg221A und Lys224 besteht (Abb. 29). Im Allgemeinen ist Na^+ für die Regulierung der Proteinaktivität verantwortlich^{9,10}, da die Na^+ -gebundene Form gerinnungshemmende Substrate schneller spaltet, während die Na^+ -freie Form weniger effizient ist und als "slow-Form" bezeichnet wird.¹¹ In Bezug auf dieser untersuchten Ligandenserie kann davon ausgegangen werden, dass dieses Kation einen elektrostatischen Einfluss auf die Ladungsverteilung des Asp189 hat und seine negative Ladung abschwächen kann. Durch eine reduzierte Ladungslokalisierung auf den Carboxylat-Sauerstoffen dieser Aminosäure wird die Wechselwirkung mit den benachbarten funktionellen Gruppen des Liganden geschwächt. Vermutlich reicht der Polarisierungseffekt für den weniger basischen Pyridinteil von **11** nicht mehr aus, um die Protonierung des Pyridin-*N* im Falle von Thrombin zu induzieren. Im Trypsinkomplex, in dem sich kein vergleichbares

Na^+ neben Asp189 befindet, ist die Ladungsabschwächung von Asp189 nicht gegeben, sodass die negativ geladene Carboxylgruppe hier stärkere Polarisierungseffekte ausübt, die anscheinend ausreichen, um eine Protonierung der P1-Kopfgruppe des Liganden zu induzieren. Gleichzeitig wird eine geordnete über Wasser-vermittelte Ladungs-Ladungs-Wechselwirkung mit dem Liganden **11** hergestellt. Diese Beobachtungen werden durch eine weitere Untersuchung unterstützt, bei der Benzylamin-Fragmente bzw. Derivate sowohl in Thrombin als auch in Trypsin kristallisiert wurden und dort abweichende Bindungsmodi erhalten wurden, die auf dem ersten Blick so nicht zu erwarten waren. Details zu dieser Studie werden im Abschnitt 5.4.1 beschrieben.

Bereits in einer früheren Studie wurde die oben genannte Hypothese vorgeschlagen, in der über eine unterschiedliche Ladungsverteilung des Asp189 zwischen Thrombin und Trypsin spekuliert wurde.⁴⁷ Die Hypothese basierte auf den abweichenden Geometrien für *N*-Amidinopiperidin in der S1-Tasche beider Proteasen, welche im Abschnitt 5.4.2 genauer erläutert werden. Es bleibt dennoch spekulativ, ob die vorgeschlagene abgeschwächte Ladung auf Asp189 in Thrombin auch für die bekannte Substratunterscheidung verantwortlich ist, da Thrombin nur Peptidketten mit dem stärker basischeren P1-Arg erkennt, während Trypsin neben P1-Arg auch die weniger basischen P1-Lys an dieser Position akzeptiert.

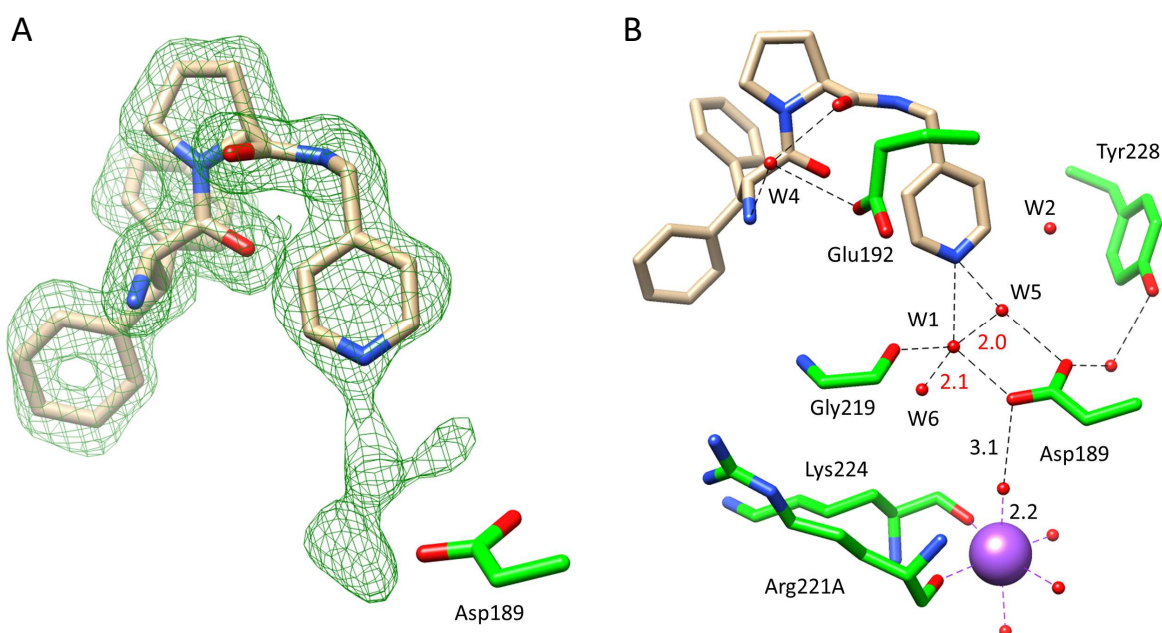


Abb. 29: (A) Ligand **11** in der S1-Tasche von Thrombin mit der mF_o-F_c -Elektronendichte (dunkelgrün). Die Erzeugung dieser Dichte erfolgte vor dem Einbau der fehlgeordneten Wassermoleküle zwischen Ligand und Asp189. (B) Bindungsmodus von **11** in der S1-Tasche von Thrombin in Gegenwart von Na^+ (violette Kugel) in unmittelbarer Nähe von Asp189. Die oktaedrische Koordination von Na^+ wird als gestrichelte Linien in violett präsentiert. Der Ligand ist in hellbraun, während die Proteinreste in grün dargestellt sind. Heteroatome sind als farbkodierte Atome gezeigt. Wassermoleküle werden als rote Kugeln und günstige Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien mit den entsprechenden Abständen in Å dargestellt.

5.4.1 Unterschiedliche Bindungsposen von Benzylamin-Derivaten in Thrombin und Trypsin

Wie bereits in 5.4 angedeutet wurde, ergaben sich überraschende Resultate bezüglich der Kristallisation von Benzylamin-Fragmenten in Thrombin und Trypsin. Dafür wurden die von *N. Abazi* (AG Klebe) gesammelten und prozessierten Datensätze in dieser Arbeit entsprechend verfeinert. In Abb. 30A sind die Strukturen von Benzylamin (Stäbchenmodell in hellbraun) sowie 4-Methylbenzylamin (Stäbchenmodell in hellblau) im Komplex mit Thrombin überlagert, die beide einen nahezu gleichen Bindungsmodus aufweisen. Beide Liganden orientieren sich nicht wie erwartet zum substratspezifischen Asp189 am Boden der S1-Tasche, sondern zeigen in Richtung Glu192 und bilden über die Aminogruppen der jeweiligen Liganden mit der Carboxygruppe des Glu192 sowie auch mit der Carbonylgruppe des Gly219 Wasserstoffbrückenbindungen aus. Ferner muss erwähnt werden, dass Benzylamin nicht wie das 4-Methylbenzylamin vollständig besetzt im Komplex vorliegt (Besetzung von 77%) und somit mit den Wassermolekülen W1 sowie W2 (Besetzung jeweils 23%) gegeneinander verfeinert wurden. Hingegen ist 4-Methylbenzylamin vollständig in der S1-Tasche besetzt, in welcher die Wassermoleküle W1 und W2 verdrängt werden. In der analogen Komplexstruktur mit Benzylamin in Trypsin (Abb. 30B) zeigt der Ligand wie erwartet mit seiner Aminogruppe zum Asp189 und geht mit der Carboxygruppe sowohl direkte Wasserstoffbrückenbindungen als auch Wasser-vermittelte Kontakte ein. Zusätzlich interagiert die Aminogruppe ebenfalls mit Gly219. Der Ligand sowie die Wassermoleküle W1 und W2 sind im Vergleich zur Thrombinstruktur jeweils vollständig besetzt, wobei W2 eine Interaktion mit der Trypsin-spezifischen Aminosäure Ser190 annimmt.

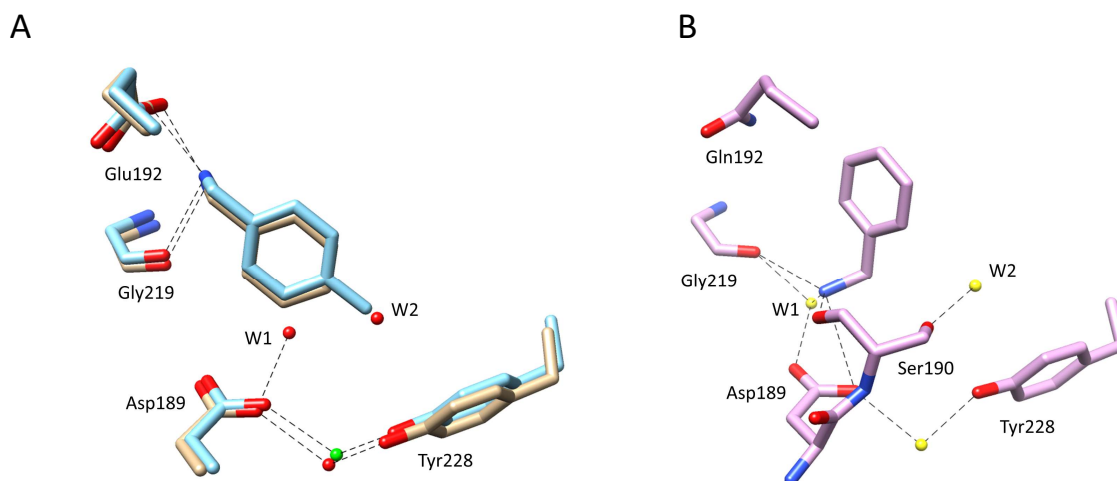
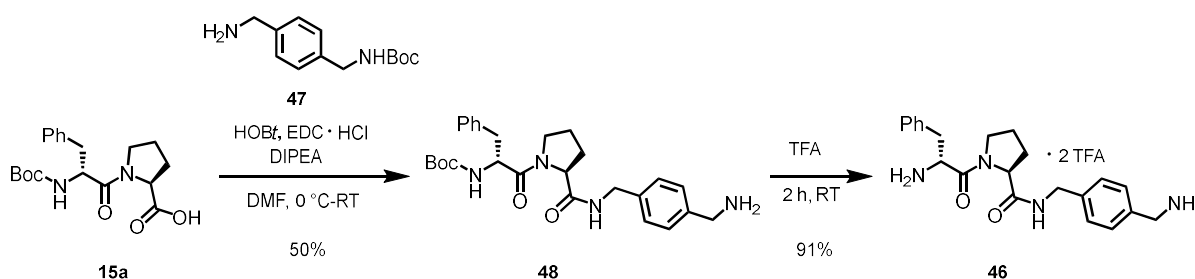


Abb. 30: (A) Benzylamin (Stäbchenmodell in hellbraun, PDB 6T56) und 4-Methylbenzylamin (Stäbchenmodell in hellblau, PDB 6T55) im Komplex mit der S1-Tasche von Thrombin. Heteroatome sind als farbkodierte Atome gezeigt. Wassermoleküle werden als Kugeln (rot für Benzylamin, grün für 4-Methylbenzylamin) und günstige Wasserstoffbrücken als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. (B) Analoge Benzylamin-Struktur (Stäbchenmodell in rosa, PDB 5MNM) in der S1-Tasche von Trypsin. Wassermoleküle werden als gelbe Kugeln dargestellt.

Die Ergebnisse verdeutlichen den unterschiedlichen Bindungsmodus von Benzylamin in beiden Serinproteasen und lassen sich mit den in Abschnitt 5.4 diskutierten Beobachtungen gut vergleichen. Durch die Anwesenheit des Natriumions in Thrombin besitzt Asp189 eine reduzierte Ladungsverteilung, sodass die polare Aminogruppe des Liganden hier keine Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxygruppe des Asp189 ausbildet. Stattdessen bevorzugt diese Aminogruppe Wechselwirkungen mit der stark negativ geladenen Aminosäure Glu192 und dreht sich vom Asp189 weg. Diese Bindungsposition geht das Methyl-Derivat ebenfalls ein. Wird die Komplexstruktur von Benzylamin in Trypsin betrachtet, so beschreibt diese den erwarteten Bindungsmodus, indem die Aminogruppe mit Asp189 sowie mit Gly219 wechselwirkt. In der Umgebung des Asp189 existiert keine Natriumbindestelle, welche die Ladungskonzentration auf der Carboxygruppe abschwächt, sodass in diesem Fall eine stärker negativ geladene funktionelle Gruppe vorliegt. Damit wird hier eine starke ladungsunterstützte Interaktion zwischen Asp189 und Ligand etabliert.

Es stellt sich die Frage, ob eine Änderung der Bindungspose ebenfalls in Thrombin stattfindet, wenn die Kopfgruppe Benzylamin in ein D-Phe-Pro-Derivat eingebunden wird. Der vergrößerte Ligand adressiert nun zusätzlich die S2- und S3/4-Tasche. Somit sollten sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der P1-Kopfgruppe und dem Asp189 „erzwingen“ lassen, wenn die Geometrie des Liganden ähnlich in Abb. 30B angepasst wird. Hierfür wurde Ligand **46** synthetisiert, welcher aus einer Kupplungsreaktion mit Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**) und das kommerziell erhältliche Amin **47** (*Sigma Aldrich*) gebildet wurde, bei der die Schutzgruppe des Kupplungsprodukts **48** analog zur Darstellung der Inhibitoren **10** mit TFA abgespalten wurde (Schema 16).



Schema 16: Synthese von Inhibitor **46** über eine analoge Kupplungsreaktion und Entschützung wie der Darstellung von **10**.

Eine ebenfalls von *N. Abazi* gesammelte Thrombin-Komplexstruktur des Inhibitors **46** wurde in dieser Arbeit entsprechend verfeinert und ist in Abb. 31 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass durch die verlängerte P2- und P3-Gruppe eine bevorzugte Bindungsposition in der S2- sowie S3/4-Tasche erfolgt. Deshalb ist aus sterischen Gründen eine Drehung der P1-Kopfgruppe unmöglich, um damit eine direkte Wechselwirkung mit Glu192 zu bilden. Folglich nimmt der P1-Baustein aufgrund des peptidischen Restes die Bindungspose mit der Aminogruppe zum Asp189 an. Glu192 tritt in zwei Konformationen

(Besetzung von 63% für I und 37% für II) auf, in der Konformation I über W3 und W4 Wasser-vermittelte Bindungen zur *N*-terminalen Aminogruppe der P1-Gruppe sowie zur Carbonylgruppe der P2-Einheit eingeht. Ersteres steht zusätzlich in Kontakt mit Gly219. Erwähnenswert ist auch, dass das Wassermolekül W1 bei der Bindung des Liganden **46** durch die benzyliche Aminogruppe aus der S1-Tasche von Thrombin verdrängt wird, was in der zuvor gezeigten Fragmentstruktur in Trypsin noch an der Bindung teilnimmt.

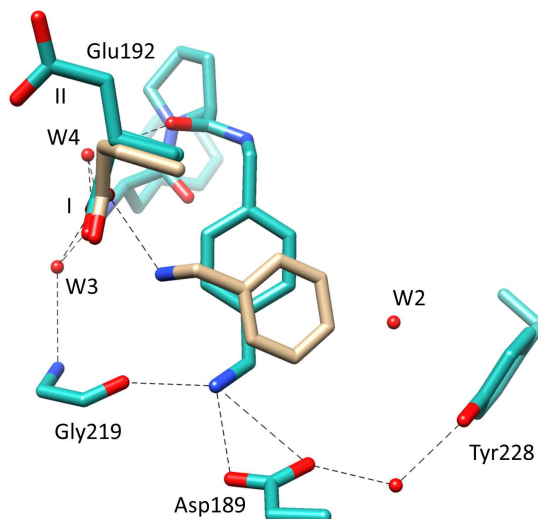


Abb. 31: Komplexstruktur von Inhibitor **46** in der S1-Tasche von Thrombin (türkises Stäbchenmodell, PDB 6T53) mit Benzylamin (hellbraunes Stäbchenmodell ohne Wassermoleküle, PDB 6T56) überlagert. Glu192 liegt in zwei Konformationen vor (Besetzung von 63% für I und 37% für II). Heteroatome sind als farbkodierte Atome gezeigt. Wassermoleküle der Komplexstruktur mit **46** sind als rote Kugeln dargestellt.

Hieraus ergibt sich, dass das Na^+ -Ion einen großen Einfluss auf die Ladungsverteilung haben muss und daraus die unterschiedlichen Bindungsmodi der Benzylamin-Derivate höchstwahrscheinlich resultieren. Vor allem bei der Betrachtung des pK_a -Werts von 9.3⁹⁹ für das einfache Benzylamin, muss die Aminogruppe bei den Kristallisationsbedingungen (pH = 7.8) zu hohem Prozentsatz protoniert vorliegen. Demzufolge sollte eigentlich die bevorzugte Ladungs-Ladungs-Wechselwirkung zwischen der protonierten Aminogruppe des Liganden und der substratspezifischen Carboxygruppe von Asp189 erfolgen. Da dies nicht auftritt, spricht diese Beobachtung ebenfalls für die abgeschwächte Lokalisierung der Elektronenverteilung auf Asp189 in Thrombin, sodass die Aminogruppe eine Interaktion mit der stärker negativ geladenen Carboxygruppe des Glu192 favorisiert. Desweiteren belegen ITC-Daten für Inhibitor **46**, dass eine Protonierung der Aminogruppe bereits in Lösung stattgefunden haben muss, da keine Änderung des Protonierungszustandes bei den Messungen festzustellen war. Es konnte lediglich eine gesamte Protonenübertragung von $\Delta n_{\text{H}^+} = 0.04$ mol Protonen in Thrombin sowie die von *J. Schiebel* ermittelten 0.21 mol Protonen in Trypsin festgestellt

werden (Tabelle 6). Somit lässt sich schlussfolgern, dass bei der Bindung von **46** in der S1-Tasche hauptsächlich der Kompensationseffekt des Protonenaustausches zwischen His57 und der N-terminalen Aminogruppe der P3-Gruppe von **46** gemessen wurde.

Tabelle 7: ΔH° und Δn_{H^+} für **46** aus direkten ITC-Titrationsen in verschiedenen Puffern für Thrombin und Trypsin.

Thrombin				Trypsin			
$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta n_{H^+} /$ mol	$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta H^\circ /$ kJ mol ⁻¹	$\Delta n_{H^+} /$ mol
HEPES	Tricin	Tris		HEPES	Tricin	Tris	
-19.6 ± 0.5	-20.5 ± 0.01	-20.6 ± 1.0	-0.04	-25.1 ± 0.4	-21.3 ± 0.1	-19.4 ± 0.3	0.21

Standardabweichungen wurden aus Dreifachmessungen bestimmt.

Eine interessante Beobachtung ergab sich bezüglich der Komplexstruktur mit Benzylamin in Thrombin, in welcher der Ligand ein zweites Mal im Protein zu finden ist (Abb. 32B). Aufgrund ihres kleinen Volumenbedarfs sind Fragmente in der Lage mehrfach zu binden, was beispielsweise bei der größeren phenolischen Verbindung **44** nicht abzusehen war, da es keine signifikanten Wechselwirkungen in der zweiten eingenommenen Bindungsposition eingeht (Abb. 25B, Abschnitt 4.3). Im zweiten Beispiel legt sich Benzylamin in die S3/4-Tasche und geht mit seiner Aminogruppe Wasserstoffbrückenbindungen zum Rückgrat des Glu97A sowie einen Wasser-vermittelten Kontakt zu Tyr60A ein. Außerdem lagert sich der Aromat des Liganden so ein, dass er dort eine leicht geneigte *edge-to-face* Wechselwirkung zum Trp215 in einem Abstand von 5.2 Å ausbildet. Ebenfalls interagieren die bisher diskutierten D-Phe-Pro-Inhibitoren mit ihrem D-Phe der P3-Gruppe mit Trp215. Beispielhaft wurde das entsprechende Benzylamin-Derivat **46** in die Thrombinstruktur des Fragments überlagert, wo eine *edge-to-face*-Anordnung ausgerichtet auf den Heteroaromaten des Trp215 mit einem Abstand von 5.6 Å eingenommen wird (Abb. 32A).

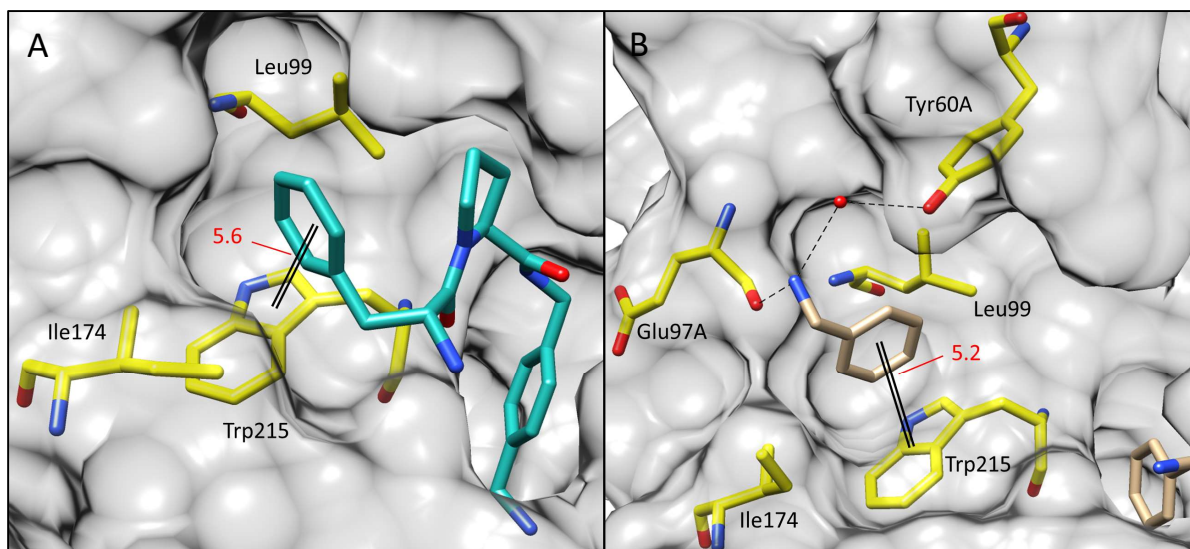


Abb. 32: (A) Inhibitor **46** (türkises Stäbchenmodell) im Komplex mit Thrombin, PDB 6T53. D-Phe mit *edge-to-face- π -stacking* zum Heteroaromaten des Trp215. (B) Benzylamin (hellbraunes Stäbchenmodell) bindet zweimal in Thrombin. Ein Fragment befindet sich in der S1-Tasche, während die zweite Bindung in der S3/S4-Tasche mit der Umgebung aus Ile174, Leu199 und Trp215 erfolgt, darunter auch eine leicht geneigte *edge-to-face*-Anordnung zu Trp215, PDB 6T56. Die Strukturoberflächen sind in grau, die Aminosäurereste in gelb, Wassermoleküle als rote Kugeln sowie Heteroatome als farbkodierte Atome gezeigt. Günstige Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt und die jeweiligen aromatischen Wechselwirkungen als schwarze parallel gezogene Linien präsentiert, die mit entsprechenden Abständen in Å (rot) angegeben sind.

5.4.2 Unterschiedliche Geometrien von *N*-Amidinopiperidin in Thrombin und Trypsin

In einer Studie von *Schiebel et al.* wurden u.a. die Bindungsmodi von *N*-Amidinopiperidin-Derivaten in der S1-Tasche von Trypsin untersucht. Wird die Geometrie der Guanidingruppe des *N*-Amidinopiperidin als Fragment mit der analogen Komplexstruktur in Thrombin von *Rühmann et al.*¹⁰⁰ verglichen, so fällt auf, dass der *ipso*-Stickstoff dieser funktionellen Gruppe mit planarer Geometrie vorliegt, während in Trypsin sowohl ein planarer als auch ein pyramidaler Hybridisierungszustand des Piperidin-*N* nachgewiesen wurde (Abb. 33).⁴⁷ Diese Pyramidalisierung geht mit einer Entkopplung der Amidgruppe aus dem benachbarten Piperidinsystem einher und erzeugt dadurch einen Verlust der elektronischen Konjugation über der gesamten Guanidingruppe. Dadurch konzentriert sich die Delokalisierung der positiven Ladung nur auf den linken Teil der Amidgruppe und ermöglicht somit eine energetisch günstigere elektrostatische Interaktion unter Bildung einer Salzbrücke mit Asp189. Dies kompensiert den Verlust der Überlappung der p-Orbitale und erklärt die Existenz von zwei Konfigurationsisomeren am endocyclischen Piperidin-*N*. Weiterhin bestätigten QM-Geometrie-Optimierungen, dass das p-Orbital am Piperidin-*N* mit seinem freien Elektronenpaar einen höheren p-Charakter im planaren als im pyramidalen Zustand hat und somit die Ladungsverteilung durch die planare Geometrie begünstigt ist.⁴⁷

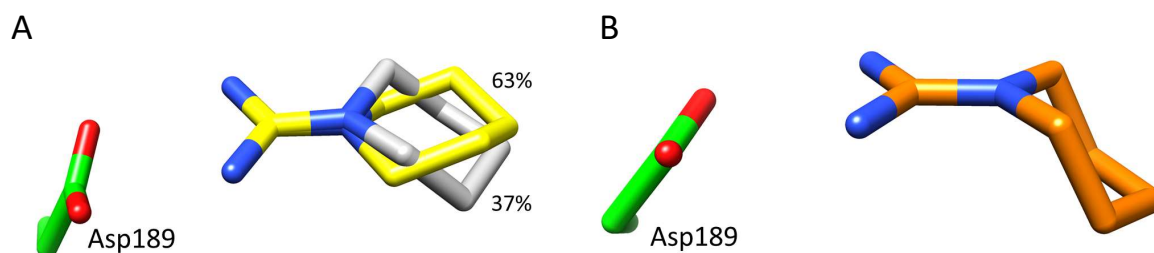
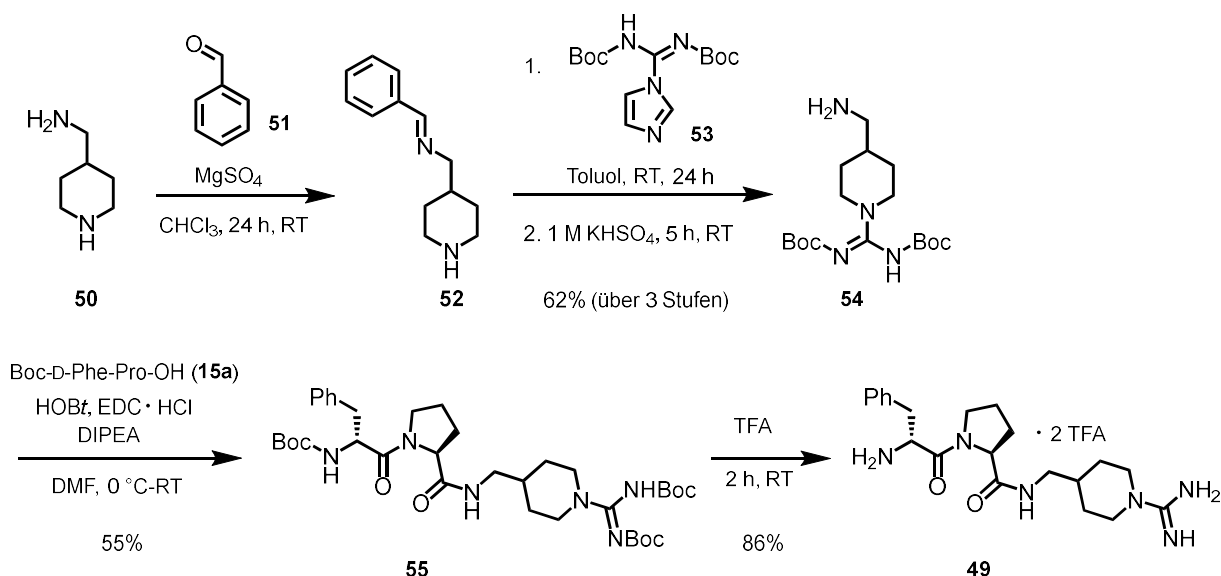


Abb. 33: *N*-Amidinopiperidin in Wechselwirkung mit Asp189 (grün) in der S1-Tasche. (A) Komplex mit Trypsin in planarer (Besetzung von 63%, graues Stäbchenmodell) sowie pyramidalen (Besetzung von 37%, gelbes Stäbchenmodell) Geometrie, PDB 5MNO.⁴⁷ (B) Analoge Komplexstruktur des gleichen Fragments mit Thrombin im planaren Zustand in orange, PDB 4UE7.¹⁰⁰ Heteroatome sind als farbkodierte Atome dargestellt.

Desweiteren wurde auch das D-Phe-Pro-Derivat **49** auf dessen geometrischen Bindungseigenschaften in der S1-Tasche von Thrombin und Trypsin untersucht. Dabei wurde die Synthese von **49** ähnlich zu *Das et al.*¹⁰¹ in Schema 17 durchgeführt, indem in der ersten Stufe die Kondensationsreaktion von 4-Aminomethylpiperidin (**50**) mit Benzaldehyd (**51**) in Gegenwart von Magnesiumsulfat erfolgte, welches das Wasser aus dem Gleichgewicht entfernte. Das Gleichgewicht verlagerte sich somit auf die Seite des Imins **52**, sodass eine Protonierung durch Wasser unterbunden wurde, um die Stabilität dieses Zwischenprodukts **52** zu gewähren.¹⁰² Verbindung **52** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt nach einer Substitutionsreaktion durch Bis-Boc-Guanidin **53** am Piperidin-*N* umgesetzt. Die anschließende saure Hydrolyse wurde mit einer 1 M Kaliumhydrogensulfat-Lösung unter Bildung des Bis-Boc-*N*-Amidinopiperidins **54** erreicht.¹⁰¹ Verbindung **54** wurde ebenfalls ohne zusätzliche Aufreinigung für die Peptidkupplung mit Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**) zu **55** verwendet, in der anschließend beide Boc-Schutzgruppen mit TFA unter Erhalt des Inhibitors **49** wieder entfernt wurden.^{46,47}



Schema 17: Synthese des Inhibitors **49** mit einer Gesamtausbeute von 29% über 5 Stufen.

Bei der Untersuchung der Komplexstrukturen des Inhibitors **49** lässt sich feststellen, dass in beiden Proteasen ausschließlich nur der pyramidale Zustand am *ipso*-Stickstoff in beiden Proteinen eingenommen wird (Abb. 34). Aus sterischen Gründen ist demzufolge Ligand **49** nicht in der Lage die planare Form an der P1-Kopfgruppe auszubilden, da der D-Phe-Pro-Rest an der axialen Position der Sesselkonformation stehen müsste, was zur Bildung von 1,3-diaxialen Wechselwirkungen führen würde. Dabei würde die Methylengruppe der P1-Kopfgruppe diese ungünstigen Interaktionen mit den in Abb. 35 gezeigten CH-Bindungen des Piperidinsessels ausbilden. Aus diesem Grund besteht für das entsprechende Fragment die Möglichkeit eine planare Form zu erhalten, welche die zuvor beschriebenen elektronischen Vorteile mit sich bringt. Folglich geht Ligand **49** den pyramidalen Bindungsmodus ein, um die D-Phe-Pro-Einheit äquatorial zu einer besten Ebene durch den Piperidinring zu stellen, sodass auch die S2- sowie S3/4-Tasche gut adressiert werden können. Hierbei scheint die Beeinflussung des Na^+ -Ions auf das Asp189 in Thrombin keine Rolle zu spielen.

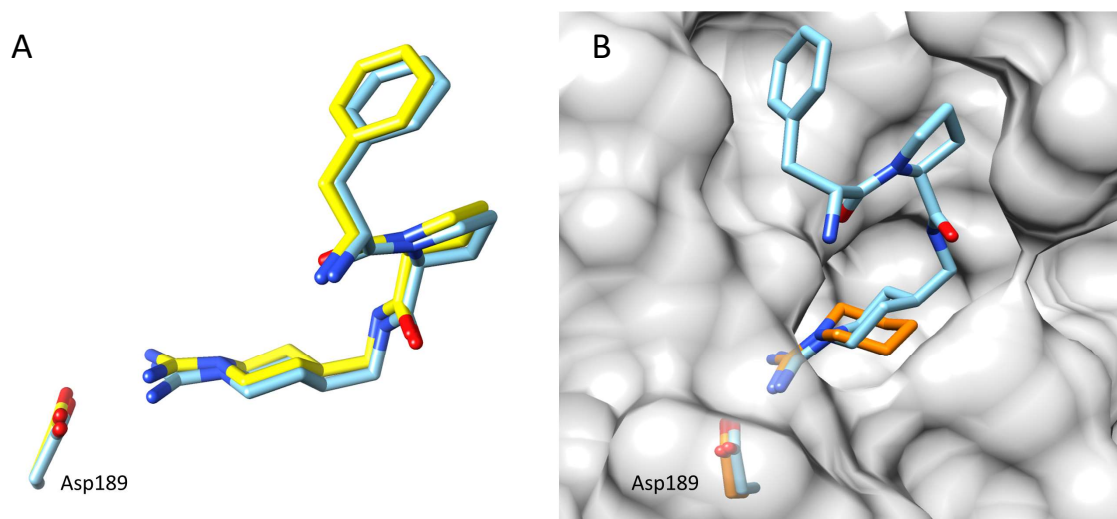


Abb. 34: (A) Inhibitor **49** im Komplex mit Thrombin (hellblaues Stäbchenmodell, PDB 6T57) und Trypsin (gelbes Stäbchenmodell, PDB 5MNQ⁴⁷). Die überlagerten Strukturen zeigen gleichen Bindungsmodus in beiden Proteinen, bei welchen die AmidinGruppe eine Salzbrücke zu Asp189 aufbaut. Der *ipso*-Stickstoff des Piperidinrings liegt jeweils in einem pyramidalen Hybridisierungszustand vor. (B) **49** in der aktiven Tasche von Thrombin mit *N*-Amidinopiperidin-Struktur (orangeses Stäbchenmodell, 4UE7¹⁰⁰) überlagert. D-Phe-Pro-Rest von **49** steht am C4-Atom in der günstigen äquatorialen Position zur Piperidinebene im pyramidalen Zustand, während das Fragment eine planare Geometrie am *ipso*-Stickstoff des Piperidinrings aufweist. Die Struktur Oberfläche ist in grau und die Heteroatome sind als farbkodierte Atome dargestellt.

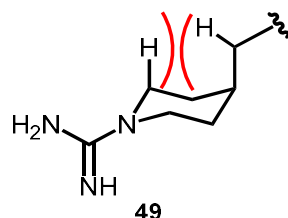
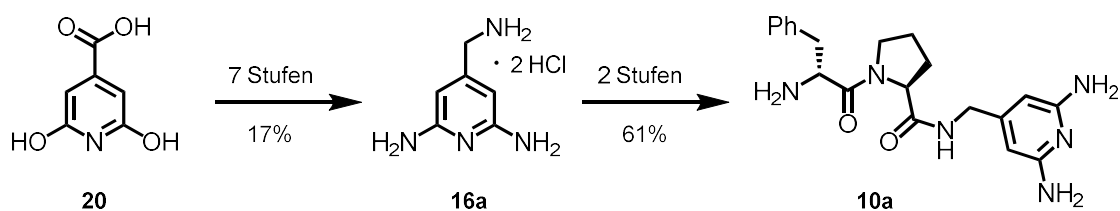


Abb. 35: P1-Kopfgruppe von Ligand **49** in der theoretisch planaren Form. Ungünstige 1,3-diaxiale-Wechselwirkungen (rot) würden beispielsweise zwischen CH-Bindung des α -C-Atoms des Piperidin-*N* und CH-Bindung der Methylengruppe am C4-Atom entstehen.

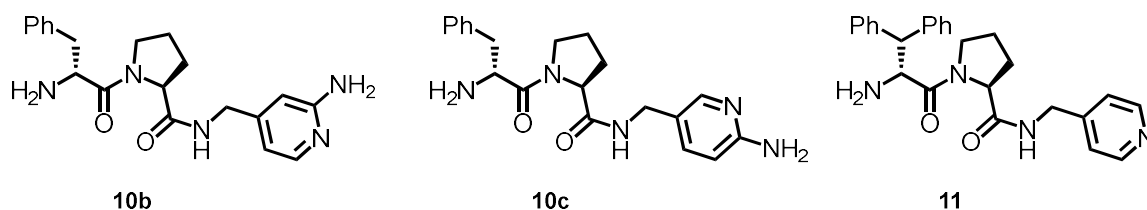
Das Bindungsverhalten des Benzylamin-Fragments zusammen mit den Resultaten aus Kapitel 5.4 und 5.4.1 verweisen auf einen Effekt der Natriumbindestelle, die zu einer vermeintlichen Ladungsabschwächung auf der Carboxylatgruppe von Asp189 in Thrombin führt. Dies resultiert in Unterschieden der eingenommenen Bindungsgeometrien, welche den Einfluss der Protonierungseigenschaften der Liganden in beiden Proteinen hervorhebt. Wie beschrieben muss der Inhibitor **49** in beiden Proteinen eine pyramidale Geometrie am endocyclischen Stickstoff der Guanidinogruppe aus sterischen Gründen annehmen. Damit erhöht sich die Konzentration der positiven Ladung auf die beiden exocyclischen Stickstoffe und trägt so zur elektrostatischen Verstärkung der Salzbrücke zu Asp189 in beiden Proteasen gleichermaßen auf.

6 Zusammenfassung

In diesem Projekt konnten erfolgreich vier D-Phe/D-Phe-Pro-basierende (Amino)pyridin-Derivate **10** sowie **11** für Thrombin und Trypsin hergestellt werden. Insbesondere stand die Darstellung des P1-Bausteins **16a** im Fokus, da die symmetrisch substituierten Aminogruppen über eine mehrstufige Synthese eingeführt werden mussten (Schema 18). Für die Inhibitoren **10b**, **10c** und **11** waren die jeweiligen P1-Gruppen kommerziell erhältlich.



Schema 18: Syntheseroute zur Darstellung des Inhibitors **10a**.



Schema 19: Weitere (Amino)pyridin-Inhibitoren **10b**, **10c**, und **11**.

Die vier Inhibitoren **10a-c** und **11** wurden kristallographisch für die Selektivitätsstudie zwischen Thrombin und Trypsin untersucht, bei der alle vier Liganden in beiden Proteinen nahezu identische Bindungsmodi aufweisen. Die Verbindungen wurden über ITC-Experimente thermodynamisch analysiert, die mit Hilfe eines enzymkinetischen Fluoreszenzassay zusätzlich validiert wurden. Während es sich bei den Inhibitoren hauptsächlich um nano-molare Inhibitoren für Thrombin handelt, ist die Bindungsaffinität der gleichen Liganden um mindestens zwei Größenordnungen in Trypsin reduziert, was auf die schwächer ausgeprägten S2- und S3/4-Taschen zurückzuführen sind. Die geringe Bindungsaffinität gegenüber Trypsin konnten auch anhand der thermodynamischen Profile aus den ITC-Messungen beobachten werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Liganden einen viel stärkeren enthalpischen Beitrag in Thrombin leisten als in Trypsin. Dieser Effekt wird weitgehend kompensiert, sodass sich die freie Gibbs-Energie ΔG° nur um etwa zwei Größenordnungen in der Dissoziationskonstante K_d unterscheidet. Durch die Untersuchung von vermeintlich überlagerten Protonierungseffekten zeigt sich, dass die etwas stärker basischen Aminopyridin-Derivate **10a-c** ($pK_a = 6.3-6.7$) in beiden Enzymen am Pyridin-N vollständig protoniert werden, während die Protonierung in

der gepufferten Lösung bei pH = 7.8 vor der Bindung kaum zu beobachten ist. Darüber hinaus setzt His57 der katalytischen Triade etwa 0.50-0.60 mol Protonen frei, die wiederum formal gesehen durch die *N*-terminale Aminogruppe aufgenommen werden. Aufgrund dieser Kompensation lässt sich schlussfolgern, dass der insgesamt beobachtete Protonierungseffekt fast ausschließlich durch die Protonierung der P1-Kopfgruppe entsteht.

Die beobachtete pK_a -Verschiebung wird durch die Polarisierung des negativ geladenen Asp189 bestimmt, die eine pK_a -Verschiebung innerhalb der S1-Tasche auslöst und damit eine Protonierung am Pyridin-*N* induziert. Ein erstaunlicher Unterschied ergibt sich für die Komplexe von **11** mit beiden Proteasen. Die Basizität des unsubstituierten Pyridin-Derivats **11** ist mit einem $pK_a = 5.0$ etwa 1.5 Einheiten niedriger als die von **10a-c** und dennoch bleibt überraschenderweise **11** im Falle von Thrombin unprotoniert, während es einen Protonierungseffekt bei der Bindung in Trypsin aufweist. Es wird angenommen, dass der Unterschied durch die Anwesenheit eines Natriumions in Thrombin, ca. 5.3 Å entfernt von Asp189, zu erklären ist. Wahrscheinlich nimmt dieses Kation einen elektrostatischen Einfluss auf die Ladungsverteilung auf Asp189, indem es die negative Ladung des Asp189 abschirmt und damit die Bindungseigenschaften in der S1-Tasche ändert. Infolgedessen kann die Carboxygruppe das Pyridin-*N*-Atom von Inhibitor **11** nicht ausreichend polarisieren, um die Protonierung einzuleiten. Durch die abgeschwächte Ladungsverteilung auf den Carboxylat-Sauerstoffen ist die Wasser-vermittelte Ladungs-Ladungs-Wechselwirkung zwischen der P1-Kopfgruppe von **11** und Asp189 nicht ausreichend, um eine Protonierung am Pyridin-*N* zu erzeugen. Im Gegensatz zu Trypsin ist die polarisierende Wirkung aufgrund des fehlenden Na^+ -Ions stark genug, um eine vollständige Protonierung am Pyridin-*N* der P1-Kopfgruppe von **11** zu erreichen.

Der Einfluss der Natriumbindestelle auf die verringerte Ladungsverteilung von Asp189 lässt sich auch auf weitere Komplexstrukturen übertragen. So zeigen Benzylamin-Fragmente unterschiedliches Bindungsverhalten in Thrombin. Sie bilden mit ihrer Aminogruppe keine Bindung zum Asp189 vermutlich aufgrund der reduzierten negativen Ladung der Carboxygruppe. Stattdessen geht die Aminogruppe der Benzylamin-Fragmente mit der stärker negativ geladenen Carboxygruppe des Glu192 Wechselwirkungen ein. Dieser Rest nimmt eine rückgefaltete Geometrie an. Wird hingegen das entsprechende D-Phe-Pro-Derivat **46** verwendet, entsteht in der S1-Tasche ein „erzwungener“ Bindungsmodus der P1-Kopfgruppe, die zum Asp189 ausgerichtet wird.

In einer weiteren Studie von *Schiebel et al.* konnten ebenfalls unterschiedliche Geometrien des *N*-Amidinopiperidins in der S1-Tasche von Trypsin festgestellt werden, bei welcher die Amidinogruppe eine Salzbrücke mit Asp189 aufbaut. Die Fragmente zeigten sowohl einen planaren (Besetzung von 63%) als auch einen pyramidalen (Besetzung von 37%) Hybridisierungszustand des *ipso*-Stickstoff, während das D-Phe-Pro-Derivat **49** nur in der pyramidalen Form gefunden werden konnte. In Thrombin hingegen weist das Fragment ausschließlich den planaren Zustand aufgrund der günstigeren

Geometrie auf, die eine Delokalisierung der Elektronen über die gesamte Amidgruppe ermöglicht. Im pyramidalen Fall wäre der p-Orbitalcharakter des *ipso*-Stickstoffs reduziert, wodurch die Mesomerie erschwert wäre. Auffallend ist, dass Inhibitor **49** in Thrombin auch den pyramidalen Zustand in der S1-Tasche annimmt wie in Trypsin. Dies lässt sich anhand der Sterik am C4-Atom des Piperidinrings erklären, indem sich das D-Phe-Pro-Segment in der bevorzugten äquatorialen Position befindet. Würde die P1-Kopfgruppe von **49** in der planaren Geometrie binden, so würde der dipeptidische Rest in der unvorteilhaften axialen Position stehen unter Bildung von ungünstigen 1,3-diaxialen Wechselwirkungen.

Letztendlich verdeutlichen die beobachteten Resultate, dass eine Beeinflussung der Bindungseigenschaften von Liganden der P1-Kopfgruppe bezüglich ihrer Protonierungszustände sowie ihrer Bindungsmodi in der S1-Tasche von Thrombin und Trypsin durch die abgeschwächte Ladungsverteilung des Asp189 erfolgen kann. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch die benachbarte Natriumbindungsstelle vom Asp189 ausgelöst, die nur in Thrombin existiert, während in Trypsin die negativ geladene Carboxygruppe des Asp189 weiterhin stark polarisiert vorliegt.

Weitere D-Phe-Pro-Kristallstrukturen beschreiben interessantes Bindungsverhalten in Thrombin wie beispielsweise D-Phe-Pro-*p*-Phenol-Derivat **44**, dass in zwei Kopien an Thrombin bindet. Einerseits liegt es in der erwarteten aktiven Tasche, in welcher die Phenolgruppe mit Asp189 wechselwirkt. Andererseits lässt sich diese Verbindung ein zweites Mal auf der stark solvatisierten Oberfläche zwischen H- und L-Kette des Proteins finden, wo der Ligand **44** keine spezifischen Bindungen zum Enzym ausbildet. Möglicherweise ist dies mit der hohen Hydrophilie des Liganden zu begründen, der diese Bindungspose ermöglicht.

In einem anderen Beispiel von Inhibitor **10c** sind unterschiedliche Bindungsmodi zwischen der trigonalen und der orthorhombischen Raumgruppe zu finden. Dabei weisen sie abweichendes Bindungsverhalten in der S1-Tasche auf, bei der sich im orthorhombischen Fall der Pyridin-N der P1-Kopfgruppe zum Tyr228 orientiert, während er in der trigonalen Kristallstruktur in Richtung des Gly219 zeigt. Dies lässt sich mit nachhaltig sterischen Kontakten in der Packung zu Molekülen in der benachbarten Einheitszelle erklären. Sie decken in der trigonalen Raumgruppe die Bindetasche teilweise ab, sodass der Ligand dort nicht die Möglichkeit hat seine günstigste Position zu finden. Hingegen ist die Bindetasche in der orthorhombischen Form stärker zur Umgebung des vermeintlichen Lösungsmittels geöffnet und der Ligand orientiert sich in diese Richtung. In der trigonalen Form, die für das *Soaking* verwendet wurde, blockiert ein Molekül aus der benachbarten Einheitszelle den Zugang zu der Bindetasche und bedingt den räumlich verschobenen Bindungsmodus.

7 Experimental Section

7.1 General Information

Enzyme Kinetic Fluorescence Assay. The inhibition of human α -thrombin (Beriplast®, CSL Behring, Marburg, Germany) was investigated by a fluorescence assay using Tos-Gly-Pro-Arg-AMC · TFA as fluorogenic substrate in black 96-well plates with a *Fluoroskan Ascent* fluorometer (*Thermo Fisher Scientific*, Vantaa, Finland; $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) according to *Stürzebecher et al.*¹⁰³ The measurements were performed at 25 °C in a buffer composed of 50 mM Tris, 154 mM NaCl, 0.01% (w/v) PEG8000 at pH 7.8. The final thrombin concentration was 80 pM while the inhibitors were dissolved in DMSO and diluted in buffer to reach a final DMSO concentration below 1% (v/v) in the assay. For the determination of the inhibition constant K_i , substrate concentrations of 2.5, 5.0 and 10 μM were used at four different inhibitor concentrations in a total volume of 140 μL . Analogically, the inhibition of bovine trypsin (Sigma Aldrich, product number T8003) was performed with Mes-D-Arg-Gly-Arg-AMC · 2 TFA as fluorogenic substrate at a protein concentration of 65 pM. Here, substrate concentrations of 6.3, 12.5 and 25 μM were used. The buffer contained 43 mM Tris, 132 mM NaCl, 0.0086% (w/v) PEG8000 at pH 7.8. The velocities were obtained from the slopes of the progress curves during a time frame of 5 min and all K_i values were determined by a non-linear fit to the *Michaelis-Menten* equation. All measurements were performed at least in triplicate.

pK_a Determination. The ionization constant pK_a of the compounds of interest were determined by *SiriusT3* pH-metric pK_a method, which is based on the potentiometric titration method reported in reference.¹⁰⁴ For the titration approx. 1.0 mg of solid sample was weighed into a vial and dissolved in 1.5 mL of water containing 0.15 M KCl as background electrolyte. The electrolyte serves to improve the measurement precision and to mimic the physiological state. The pH of the dilute sample solution was adjusted to pH 2.0 by addition of 0.5 M HCl and then titrated with standardized base (0.5 M KOH) to pH 12.0 at 25 °C under argon atmosphere. During the titration more than 25 pH readings (volume of titrant vs. pH) were collected and compared with a blank titration (without sample). The resulted shape of the curve indicates the amount of substance present and its characteristic acid–base ionization properties. pK_a results were calculated by *SIRIUS T3 Refine* Version 1.1.

ITC Data Collection. All ITC experiments were performed on a Microcal ITC₂₀₀ (Malvern) device at 25 °C with a reference power of 5 $\mu\text{cal s}^{-1}$. To determine the thermodynamic profiles including protonation effects in thrombin, a direct titration was used for all four ligands. Ligand solutions of 0.4 mM **10a**, 0.6 mM **10b**, 0.3 mM **10c** and 1.5 mM **11** were titrated into 40, 60, 30 or 150 μM thrombin, respectively. Thrombin samples were prepared by a solution of human α -thrombin (Beriplast®, CSL Behring, Marburg, Germany) in a buffer of 100 mM NaCl, 0.1% (w/v) PEG8000 and 50 mM phosphate, HEPES, Tricine or Tris at pH 7.8 which was dialyzed at 4 °C overnight. Ligands were dissolved in the same buffer with 3% (v/v) DMSO in order to assure a complete solubility. The titration protocol consisted of an initial volume of 0.3 μL and 12-22 injections between 1.3-1.5 μL separated by an interval of 180 s. To collect the ITC data for trypsin, two titration protocols were used. The direct direction was performed for **10a-c** with a ligand concentration of 2.5 mM which were titrated into 125 μM trypsin to determine the protonation states whereas a displacement titration was used for ligand **11** due to its lower affinity toward trypsin. Trypsin samples were prepared by a solution of bovine- β -trypsin (Sigma Aldrich, product number T8003) in a buffer of 80 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 0.1% (w/v) PEG8000 and 100 mM HEPES, Tricine or Tris at pH 7.6 which was dialyzed at 4 °C overnight. Ligands were dissolved in the same buffer with 3% (v/v) DMSO in order to support a complete solubility as for the ligand preparation in thrombin. An initial volume of 0.3 μL was followed by 28-30 injections with a volume of 1.1 μL using 180 s as interval time for the direct titration while 19 injections were chosen with 1.9 μL volume and the same interval time for the displacement titration. According to this, 40 μM trypsin was pre-incubated with 3.4 mM of **11** using compound **45** (Table 6) as a displacement ligand with a concentration 0.4 mM. The displacement ligand **45** was analyzed in a direct measurement with a ligand concentration of 0.3 mM which was titrated into 30 μM trypsin. To confirm the dissociation constants K_D of **10a-c** from the direct titrations, the displacement titration was additionally performed in 40 μM trypsin (pre-incubated with 0.22 mM **10a**, 0.45 mM **10b** or 0.35 mM **10c**) after the same procedure as above. The ligand concentrations for the pre-incubation of the protein were calculated according to a previous study in order to reach a saturation goal of 87% which is based on the K_i values from the fluorescence assay. All ITC titrations were performed at least in triplicate and the raw thermograms were analyzed with NITPIC¹⁰⁵ (version 1.1.8) and SEDPHAT¹⁰⁶ (version 10.58d).

Crystallization. Human α -thrombin (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) was dissolved in a crystallization buffer consisting of 20 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 350 mM NaCl and 2 mM benzamidine at a concentration of 10 mg mL^{-1} . A hirudin fragment (residues 54-65, Bachem, Bubendorf, Switzerland) was dissolved in the crystallization buffer at 2.5 mg mL^{-1} . The two solutions were mixed in a ratio of 80% thrombin solution and 20% hirudin solution. The mixture was incubated for 1 h at 4 °C and centrifuged for 5 min. Thrombin crystals were grown at 4 °C by the hanging-drop

vapor diffusion method in 2 μL crystallization drops, respectively. 1 μL of the mixture thrombin-hirudin was placed on a cover slide with 1 μL of reservoir buffer composed of 20 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 27% (w/v) PEG 8000 followed by microseeding. After three weeks thrombin crystals were obtained in good diffracting quality for soaking. The soaking solution (50% crystallization buffer and 50% reservoir buffer) was combined with the ligand solution in a final concentration of 5 mM ligand and 10% DMSO. The crystals were soaked for 24 h remaining at 4 °C and were flash-frozen in liquid nitrogen in a cryoprotectant solution of reservoir buffer, 20% glycerol and 5 mM of the respective ligand. Bovine- β -trypsin was dissolved at a concentration of 20 mg mL^{-1} in 10 mM CaCl_2 , 1 mM HCl, 3 mM **10a-c** or 6 mM **11** and 6% (v/v) DMSO. Orthorhombic trypsin crystals were grown at 18 °C on sitting-drop plates in 2 μL crystallization drops, respectively. Each crystallization drop consisted of 1 μL trypsin-ligand solution and 1 μL reservoir buffer which contained 0.1 M imidazole, 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% (w/v) NaN_3 and 25-27% (w/v) PEG8000 at pH 7-8. The crystals finished growing after 7 days and were flash-frozen in liquid nitrogen in a cryoprotectant solution composed of reservoir buffer, 20% glycerol and 3-6 mM of the respective ligand. Trigonal trypsin crystals were grown at 18 °C by the hanging-drop vapor diffusion method in 2 μL crystallization drops, respectively. 1 μL of trypsin-solution consisting of HEPES 15 mM (pH 7.0) and CaCl_2 7.5 mM at a trypsin concentration of 45 mg mL^{-1} was placed on a cover slide with 1 μL of reservoir buffer composed of 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% (w/v) PEG8000, 25% (w/v) ethylene glycol and HEPES 0.1 M at pH 7.5. After seven days trypsin crystals were obtained in good diffracting quality for soaking. The soaking solution (reservoir buffer) was combined with 10% glycerol and ligand solution in a final concentration of 100 mM ligand and 10% DMSO. The crystals were soaked for 5 min remaining at 18 °C and were flash-frozen in liquid nitrogen.

X-ray Data Collection, Structure Determination and Refinement. The data collection of all crystals was performed on beamline 14.1 and 14.2 at BESSY II (Berlin, Germany) or on EMBL beamline P13 at DESY (Hamburg, Germany) which are both equipped with a Dectris Pilatus 6M detector or Marmosaic 225. The data were processed using *XDS*¹⁰⁷ and *XDSAPP2.0*.¹⁰⁸ The starting model was generated by molecular replacement using *Phaser* (version 2.5.7-2.7.17)¹⁰⁹ with the PDB structures 2ZGB or 1H8D for thrombin and 5MNK for trypsin as search models. The structures were refined using *Phenix.refine* (version 1.10.1-1.15.2)¹¹⁰ against structure factor amplitudes in five cycles for each refinement. *Coot* (version 0.7.2-0.8.9.1)¹¹¹ was used to generate and to build a model into σ -weighted maps ($2mF_o-DF_c$ and mF_o-DF_c). Simulated annealing was performed in the first step to remove potential bias from the search model. Thrombin complex structures with inhibitor **10b**, **10c**, **44**, benzylamine and **46** were refined anisotropically, whereas the thrombin complexes with **10a**, **11**, 4-methylbenzylamine and **49** were refined isotropically. TLS parameters were used subsequently to these isotropic refinements, whereupon the definition of the TLS groups was done with *Phenix.refine*.¹¹⁰ For the trypsin complex

structure with inhibitor **10a**, the *B*-factors were refined isotropically with TLS groups, whereas with **10c** (trigonal space group), the refinement was performed isotropically without TLS groups. In all remaining trypsin structures, anisotropic *B*-factor refinement was applied. Multiple sidechain conformations, water molecules, ions, solvents and ligands were built into the model and maintained during the refinement if the minor populated side chain displayed at least 20% occupancy. Further data and refinement statistics are described in Tables 8 and 10.

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Experimental Section

Table 8: X-ray Data Collection and Refinement Statistics for Thrombin Structures of **10** and **11**.

	Ligand (PDB code)			
	10a (6HSX)	10b (6T3Q)	10c (6T4A)	11 (6TDT)
Data Collection and Processing				
Wavelength (Å)	0.9184	0.9184	0.9184	0.9184
Beamline	BESSY, 14.1	BESSY, 14.2	BESSY, 14.2	BESSY, 14.1
Detector	PILATUS 6M	Marmosaic 225 mm	Marmosaic 225 mm	PILATUS 6M
Space group	C121	C121	C121	C121
Unit cell parameters:				
a, b, c (Å)	70.0, 71.7, 72.6	70.0, 71.3, 72.6	70.2, 71.3, 72.5	70.0, 71.7, 72.1
α, β, γ (°)	90.0, 100.4, 90.0	90.0, 100.6, 90.0	90.0, 100.6, 90.0	90.0, 100.2, 90.0
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	2.5	2.5	2.5	2.5
Solvent content (%)	52	51	51	51
Diffraction Data^a				
Resolution range (Å)	43.50-1.56 (1.59-1.56)	50.00-1.33 (1.35-1.33)	50.00-1.31 (1.33-1.31)	43.36-1.53 (1.62-1.53)
Unique reflections	49365 (7727)	80331 (4048)	84043 (4191)	52277 (8431)
Redundancy	3.4 (3.5)	3.8 (3.5)	3.3 (3.2)	3.4 (3.5)
$R(I)_{\text{sym}}$ (%)	4.0 (49.0)	4.6 (49.5)	4.3 (43.2)	8.5 (47.3)
Wilson B factor (Å ²)	19.6	11.8	11.1	15.5
Completeness (%)	97.6 (95.2)	100 (100)	99.9 (99.9)	98.7 (98.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	17.4 (2.5)	26.8 (2.6)	26.7 (2.7)	8.6 (2.1)
Refinement				
Resolution range (Å)	43.51-1.56	18.51-1.33	35.63-1.31	43.36-1.53
Reflections (work/free)	46896 / 2469	76296 / 4035	79852 / 4189	49662 / 2611
Final R value for all reflections (work/free) (%)	16.2 / 18.4	12.5 / 14.6	12.7 / 14.8	16.1 / 17.7
Protein residues (L chain / H chain)	28 / 250	29 / 251	28 / 251	31 / 251
Residues of hirudin (I chain)	11	10	10	11
Sodium atoms	2	2	2	2
Inhibitor atoms	28	35	27	32
Water molecules	229	257	262	253
RMSD from ideality:				
Bond lengths (Å)	0.008	0.007	0.006	0.008
Bond angles (°)	0.993	1.046	0.994	1.030

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Experimental Section

Ramachandran plot (%) ^b :				
Most favored regions	86.1	87.0	85.7	87.9
Additionally allowed regions	13.5	12.6	14.3	11.7
Generously allowed regions	0.4	0.4	0.0	0.4
Disallowed regions	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean <i>B</i> factors (Å ²) ^c :				
Protein (L chain + H chain)	26.6	17.0	15.9	19.7
Ligand	20.1	12.1	11.4	19.5
Water molecules	33.7	28.4	26.8	27.0

^aValues in parenthesis refer to the highest resolution shell

^bCalculated using PROCHECK¹¹²

^cCalculated using MOLEMAN excluding hydrogen atoms^{113,114}

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Experimental Section

Table 9: X-ray Data Collection and Refinement Statistics for Thrombin Structures from Section 4.3.

	Ligand (PDB code)				
	44 (6T3M)	Benzylamine (6T56)	4-Methylbenzylamine (6T55)	46 (6T53)	49 (6T57)
Data Collection and Processing					
Wavelength (Å)	0.9184	0.9184	0.9184	0.9184	0.9184
Beamline	BESSY, 14.1	BESSY, 14.2	BESSY, 14.1	BESSY, 14.1	BESSY, 14.1
Detector	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M
Space group	C121	C121	C121	C121	C121
Unit cell parameters:					
a, b, c (Å)	70.3, 71.5, 72.6	70.6, 71.0, 72.8	70.3, 71.3, 72.4	70.2, 71.4, 72.5	70.0, 71.7, 73.3
α, β, γ (°)	90.0, 100.6, 90.0	90.0, 100.5, 90.0	90.0, 100.2, 90.0	90.0, 100.6, 90.0	90.0, 100.7, 90.0
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	2.6	2.5	2.5	2.5	2.6
Solvent content (%)	53	52	51	51	52
Diffraction Data^a					
Resolution range (Å)	38.45-1.38 (1.46-1.38)	50.00-1.33 (1.39-1.31)	49.66-1.39 (1.48-1.39)	43.49-1.35 (1.43-1.35)	43.74-1.57 (1.66-1.57)
Unique reflections	70426 (11450)	82966 (13286)	68518 (10990)	75527 (12186)	48242 (7633)
Redundancy	2.6 (2.6)	3.1 (3.0)	2.9 (2.7)	3.1 (3.0)	3.5 (3.6)
$R(I)_{\text{sym}}$ (%)	4.5 (27.1)	4.3 (52.1)	3.5 (50.1)	5.2 (51.0)	4.2 (48.2)
Wilson B factor (Å ²)	13.7	15.0	16.6	12.4	23.9
Completeness (%)	97.0 (98.0)	97.8 (97.2)	97.7 (97.2)	98.0 (98.0)	96.3 (94.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	12.3 (3.0)	12.6 (2.1)	14.9 (1.9)	13.3 (2.3)	15.0 (2.3)
Refinement					
Resolution range (Å)	35.74-1.38	34.69-1.31	49.66-1.39	38.41-1.35	43.73-1.37
Reflections (work/free)	66904 / 3522	78817 / 4148	65092 / 3425	71749 / 3777	45829 / 2411
Final R value for all reflections (work/free) (%)	13.3 / 15.8	14.0 / 16.3	15.4 / 17.2	12.9 / 13.1	19.3 / 21.3
Protein residues (L chain / H chain)	30 / 251	30 / 250	29 / 250	28 / 251	28 / 250
Residues of hirudin (I chain)	10	10	11	11	11
Sodium atoms	2	2	2	2	2
Inhibitor atoms	54	16	9	28	29
Water molecules	248	225	251	290	156
RMSD from ideality:					
Bond lengths (Å)	0.007	0.007	0.008	0.007	0.007
Bond angles (°)	1.022	0.999	1.023	1.018	0.888

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Experimental Section

Ramachandran plot (%) ^b :					
Most favored regions	86.6	86.2	84.9	86.6	84.4
Additionally allowed regions	13.0	13.8	15.1	13.4	15.2
Generously allowed regions	0.4	0.0	0.0	0.0	0.4
Disallowed regions	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean <i>B</i> factors (Å ²) ^c :					
Protein (L chain + H chain)	18.5	21.7	23.7	17.1	33.4
Inhibitor	20.0	24.7	16.7	15.1	28.2
Water molecules	29.6	32.3	31.7	30.2	38.9

^aValues in parenthesis refer to the highest resolution shell

^bCalculated using PROCHECK¹¹²

^cCalculated using MOLEMAN excluding hydrogen atoms^{113,114}

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Experimental Section

Table 10: X-ray Data Collection and Refinement Statistics for Trypsin Structures of **10** and **11**.

	Ligand (PDB code)				
	10a (6TOM)	10b (6TOP)	10c ^d (6T5W)	10c ^d (6QL0)	11 (6SY3)
Data Collection and Processing					
Wavelength (Å)	0.9763	0.9763	0.9184	0.9184	0.9184
Beamline	DESY, P13	DESY, P13	BESSY, 14.1	BESSY, 14.1	BESSY, 14.1
Detector	PILATUS 6M-F	PILATUS 6M-F	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters:					
a, b, c (Å)	54.5, 56.8, 66.7	54.6, 56.7, 66.7	54.2, 56.8, 66.2	54.7, 54.7, 106.3	54.5, 58.5, 66.6
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 90.0
Matthews coefficient (Å ³ /Da)	2.0	2.0	2.0	1.9	2.2
Solvent content (%)	38	38	38	36	44
Diffraction Data^a					
Resolution range (Å)	43.22-1.51 (1.60-1.51)	43.18-1.19 (1.26-1.19)	43.12-1.13 (1.35-1.33)	47.34-1.63 (1.73-1.63)	43.10-0.95 (1.01-0.95)
Unique reflections	33113 (5172)	66940 (10620)	76852 (12065)	23253 (3510)	127398 (19451)
Redundancy	5.8 (5.6)	5.7 (5.7)	5.0 (4.8)	7.6 (7.8)	4.1 (3.2)
<i>R</i> (<i>I</i>) _{sym} (%)	5.5 (48.7)	5.3 (49.2)	5.2 (56.5)	17.3 (50.4)	3.8 (49.1)
Wilson <i>B</i> factor (Å ²)	16.0	12.6	11.3	22.5	8.7
Completeness (%)	99.4 (97.5)	99.6 (98.9)	99.5 (97.8)	99.0 (94.3)	98.0 (93.3)
< <i>I</i> /σ(<i>I</i>)>	17.5 (3.1)	15.0 (2.8)	14.6 (2.6)	7.2 (2.5)	16.0 (1.8)
Refinement					
Resolution range (Å)	43.22-1.51	42.22-1.19	43.11-1.13	47.34-1.63	33.80-0.95
Reflections (work/free)	31457 / 1655	63593 / 3347	73009 / 3843	22090 / 1163	125174 / 2224
Final <i>R</i> value for all reflections (work/free) (%)	14.8 / 17.1	12.3 / 13.9	12.8 / 14.5	15.8 / 19.5	12.4 / 13.4
Protein residues	223	223	223	223	223
Calcium atoms	1	1	1	1	1
Inhibitor atoms	28	27	36	27	32
Water molecules	173	202	201	165	233
RMSD from ideality:					
Bond lengths (Å)	0.007	0.006	0.005	0.007	0.005
Bond angles (°)	0.935	0.906	0.903	0.930	0.944

Teil 1 – Thrombin und Trypsin: Experimental Section

Ramachandran plot (%) ^b :					
Most favored regions	86.2	87.2	85.6	87.2	86.7
Additionally allowed regions	13.8	12.8	14.4	12.8	13.3
Generously allowed regions	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Disallowed regions	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean <i>B</i> factors (Å ²) ^c :					
Protein	17.4	14.0	12.8	17.4	10.5
Ligand	21.4	15.2	11.4	10.9	23.6
Water molecules	28.5	27.4	26.1	23.6	25.4

^aValues in parenthesis refer to the highest resolution shell

^bCalculated using PROCHECK¹¹²

^cCalculated using MOLEMAN excluding hydrogen atoms^{113,114}

^dTrypsin complex structures were found in two different space groups with ligand **10c**.

Synthesis. ^1H and ^{13}C NMR spectra were measured on a JEOL ECX-400 or JEOL ECA-500 instrument. Chemical shifts are reported in ppm using residual peaks for the deuterated solvents as internal standard:¹¹⁵ 7.26 ppm (^1H NMR), 77.2 ppm (^{13}C NMR), CDCl_3 ; 2.50 ppm (^1H NMR), 39.5 ppm (^{13}C NMR), $\text{DMSO}-d_6$. The multiplicity of the signals is described with the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublet, m = multiplet, br = broad signal. The coupling constants J are given in Hz. NMR spectra of the inhibitors **10** and **11** represent the signals of the main conformer. MS spectra were measured on a Q-Trap 2000 system with an electrospray interface (ESI). The molecular weight is presented in brackets (see procedures in section 7.3) and was used to calculate the yield of each compound. The exact mass of each compound was calculated by MS (ESI). Flash column chromatography was performed on silica gel (0.04-0.063 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and was monitored by TLC on aluminium sheets (Silicagel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany) with UV light at 254 nm or 366 nm. Preparative HPLC was performed with a Varian HPLC system gradient system (reversed-phase column: Nucleodur C_{18} , 5 μm , 100 Å, 32 x 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany). All solvents were HPLC grade and in a gradient run the percentage of acetonitrile was increased by 0.5% solvent min^{-1} at a flow rate of 20 mL min^{-1} . The purity of all inhibitors used for this study was at least 95% as determined by analytical HPLC with a Shimadzu LC-10A system (reversed-phase column: Nucleodur C_{18} , 5 μm , 100 Å, 4.6 x 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany). All solvents were HPLC grade and in a gradient run the percentage of acetonitrile was increased by 1% solvent min^{-1} at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The detection was recorded at a wavelength of 220 nm. The inhibitors **10** and **11** were obtained as double TFA salts after lyophilization.

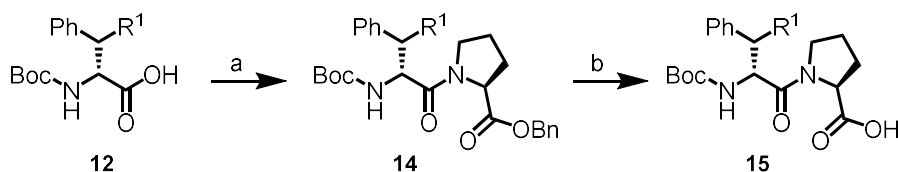
7.2 General Procedures (GP) for the Synthesis

GP1. Boc-D-Phe/D-DiPhe-Pro-OH⁹⁰ (1.0 eq, Boc-D-DiPhe-Pro-OH only for **11**) and amine **16a-d** (1.1 eq) were dissolved in DMF (5 mL), followed by the addition of HOBt hydrate (1.1 eq), EDC hydrochloride (1.1 eq) and DIPEA (2.5-3.5 eq) at 0 °C. The mixture was stirred 16-24 h at 0 °C-rt and was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The resulting organic solution was washed with 0.2 M HCl-solution (3 x 15 mL), saturated NaHCO_3 -solution (3 x 15 mL) and brine (15 mL). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography.

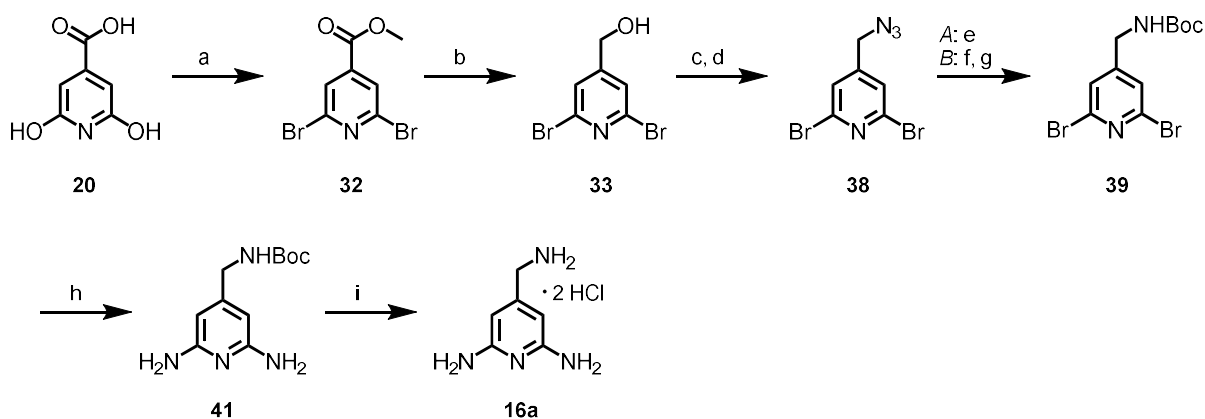
GP2. Compound **17a-d** (1.0 eq) was dissolved in TFA (10 eq.). The mixture was stirred for 2 h and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative HPLC.

7.3 Detailed Procedures of Synthesized Compounds

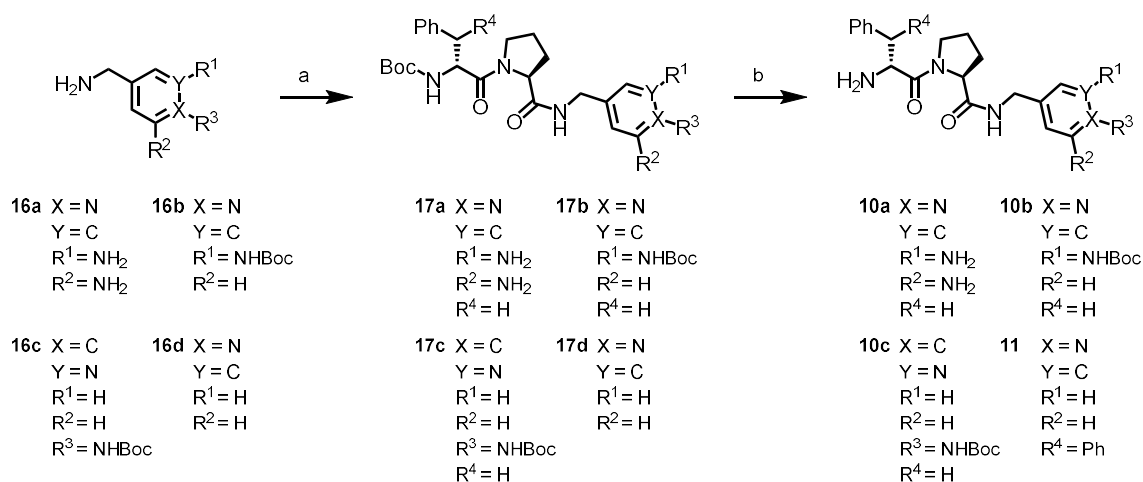
All performed reactions of this project are summarized in Scheme 20-24.



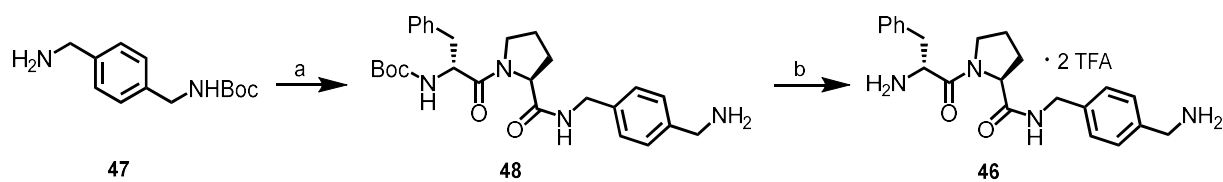
Scheme 20: Synthesis of Boc-D-Phe/D-DiPhe Pro-OH (**15**). a) HOBt, EDC · HCl, DIPEA, DCM, 0 °C-rt, 18 h, 94%; b) H₂, Pd/C, MeOH, rt, 24 h, quantitative yield. R¹ = H (**14a**, **15a**) or Ph (**14b**, **15b**).



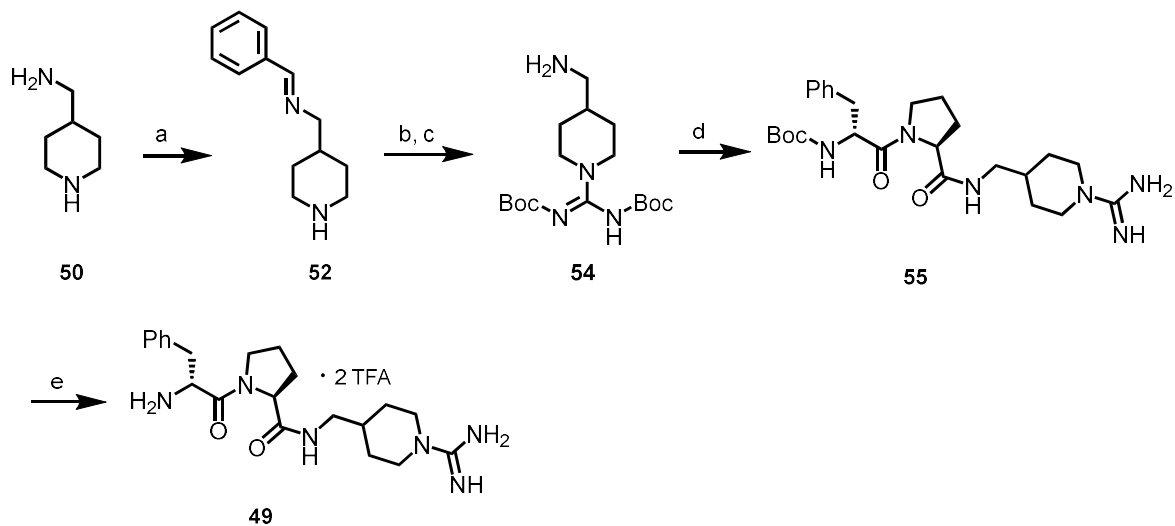
Scheme 21: Overview of all performed reactions for the synthesis of P1 building block **16a**. a) POBr₃, 130-150 °C, 2 h then MeOH, 0 °C-rt, 15 h, 74%; b) NaBH₄, MeOH, 65 °C, 3 h, 91%; c) PBr₃, 1,4-dioxane, 40 °C, 3 h; d) NaN₃, DMF, rt, 24 h, 66% (over 2 steps); e) PMe₃, THF, 0 °C-rt, 3 h then Boc₂O, NEt₃, THF, 0 °C-rt, 3 h, 50%; f) 25% (w/v) NH₃(aq), Cu₂O, DMEDA, K₂CO₃, ethylene glycol, 60 °C, 16 h, 63%; g) 4 M HCl in 1,4-dioxane, rt, 3 h, 95%.



Scheme 22. Overview of all performed reactions for the synthesis of inhibitor **10** and **11**. a) Boc-D-Phe-Pro-OH (for **15-17**), Boc-D-DiPhe-Pro-OH (for **18**), HOBt, EDC · HCl, DMF, DIPEA, 0 °C-rt, 18-24 h, 65-78%; b) TFA, rt, 2 h, 78-92%. R³ exists only for **10c**, **16c** and **17c**.

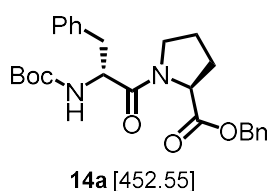


Scheme 23: Synthesis of inhibitor **46** according to Scheme 22. a) Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**), HOBT, EDC · HCl, DIPEA, 0 °C-rt, 18-24 h, 50%; b) TFA, rt, 2 h, 91%.

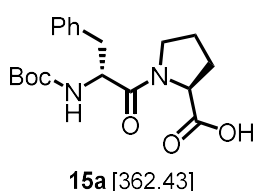


Scheme 24: Overview of all performed reactions for the synthesis of inhibitor **49**. a) Benzaldehyde (**51**), MgSO₄, CHCl₃, rt, 24 h; b) Bis-Boc-guanidine **53**, toluene, rt, 24 h; c) 1 M KHSO₄, 5 h, rt, 62% (over 3 steps); d) Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**), HOBT, EDC · HCl, DIPEA, 0 °C-rt, 18-24 h, 55%; e) TFA, rt, 2h, 86%.

7.3.1 Synthesis of Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**)

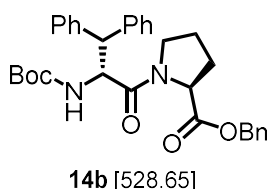


Boc-D-Phe-Pro-OBn (14a): L-Proline benzyl ester hydrochloride (**13**) (1.20 g, 4.96 mmol), Boc-D-Phe-OH (**12a**) (1.44 g, 5.46 mmol) and HOBt hydrate (0.836 g, 5.46 mmol) were dissolved in DCM (50 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. EDC hydrochloride (1.04 g, 5.46 mmol) and DIPEA (1.9 mL, 10.9 mmol) were slowly added and the mixture was stirred for 18 h at rt. The solvent was concentrated in vacuo and the resulting residue was dissolved in EtOAc (50 mL). The organic solution was washed with 0.2 M HCl-solution (3 x 25 mL), saturated NaHCO₃-solution (3 x 25 mL) and brine. The solution was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. **14a** (2.15 g, 4.75 mmol, 94%) was obtained as a colorless resin without further purification. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.35-7.16 (m, 10H), 7.02-7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.20-5.02 (m, 2H), 4.49-4.44 (m, 1H), 4.26-4.23 (dd, *J* = 8.8, 3.8 Hz, 1H), 3.64-3.40 (m, 1H), 3.25-3.20 (m, 1H), 2.91-2.68 (m, 2H), 2.28-1.70 (m, 4H), 1.30 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 171.5, 170.2, 154.9, 137.5, 136.0, 129.3, 128.4, 128.0, 127.9, 127.5, 126.3, 78.0, 65.6, 58.6, 53.3, 46.3, 37.3, 28.5, 28.1, 24.3. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₂₆H₃₆N₃O₅ [M+NH₄]⁺: 470.26; found: 470.32.

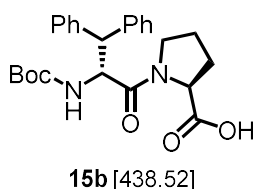


Boc-D-Phe-Pro-OH (15a): Boc-D-Phe-Pro-OBn (**14a**) (2.00 g, 4.41 mmol) was dissolved in MeOH (90 mL) and Palladium on activated charcoal (0.235 g, 0.221 mmol) added. The mixture was stirred for 24 h under hydrogen atmosphere (1 atm) at rt. The catalyst was filtered, washed with MeOH and the solvent was concentrated in vacuo. **15a** (1.59 g, 4.39 mmol, quantitative yield) was obtained as a white solid without further purification. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.32 (s, br, 1H), 7.26-7.14 (m, 5H), 6.91-6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.44-4.38 (m, 1H), 4.10-4.07 (dd, *J* = 8.6, 3.6 Hz, 1H), 3.57-3.36 (m, 1H), 3.21-3.13 (m, 1H), 2.86-2.70 (m, 2H), 2.22-1.66 (m, 4H), 1.27 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 173.0, 169.8, 154.9, 137.6, 129.3, 128.0, 126.3, 77.9, 58.6, 53.3, 46.2, 37.4, 28.6, 28.1, 24.2. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₁₉H₂₇N₂O₅ [M+H]⁺: 363.19; found: 363.28.

7.3.2 Synthesis of Boc-D-DiPhe-Pro-OH (**15b**)

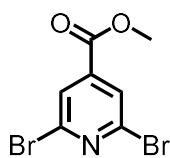


Boc-D-DiPhe-Pro-OBn (14b): L-Proline benzyl ester hydrochloride (**13**) (0.450 g, 1.86 mmol), Boc-D-DiPhe-OH (**12b**) (0.699 g, 2.04 mmol) and HOBT hydrate (0.313 g, 2.04 mmol) were dissolved in DCM (18 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. EDC hydrochloride (0.392 g, 2.04 mmol) and DIPEA (0.71 mL, 4.09 mmol) were slowly added and the mixture was stirred for 17 h at rt. The solvent was concentrated in vacuo and the resulting residue was dissolved in EtOAc (20 mL). The organic solution was washed with 0.2 M HCl-solution (3 x 25 mL), saturated NaHCO₃-solution (3 x 25 mL) and brine. The solution was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. **14b** (0.968 g, 1.83 mmol, 98%) was obtained as a colorless resin without further purification. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.36-7.11 (m, 16H), 5.20-4.97 (m, 3H), 4.39-4.36 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 3.87-3.84 (m, 1H), 3.77-3.71 (m, 1H), 3.22-3.16 (m, 1H), 1.80-1.47 (m, 4H), 1.24 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 171.3, 169.5, 155.1, 141.1, 141.0, 136.0, 128.6, 128.4, 128.2, 128.1, 127.9, 127.5, 126.6, 126.2, 78.0, 65.6, 58.1, 53.9, 52.8, 46.5, 28.4, 28.0, 24.1. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₃₂H₄₀N₃O₅ [M+NH₄]⁺: 546.29; found: 546.36.

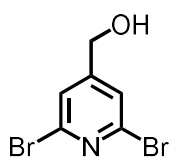


Boc-D-DiPhe-Pro-OH (15b): Boc-D-DiPhe-Pro-OBn (**14b**) (1.40 g, 2.64 mmol) was dissolved in MeOH (90 mL) and Palladium on activated charcoal (0.140 g, 0.132 mmol) added. The mixture was stirred for 24 h under hydrogen atmosphere (1 atm) at rt. The catalyst was filtered, washed with MeOH and the solvent was concentrated in vacuo. **15b** (1.15 g, 2.64 mmol, quantitative yield) was obtained as a white solid without further purification. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.27 (s, br, 1H), 7.36-7.13 (m, 11H), 5.18-5.13 (dd, *J* = 11.5, 9.6 Hz, 1H), 4.38-4.35 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.75-3.55 (m, 2H), 3.19-3.13 (m, 1H), 1.79-1.48 (m, 4H), 1.26 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 172.8, 169.2, 155.0, 141.1, 141.0, 128.6, 128.2, 128.1, 127.9, 126.5, 126.1, 78.0, 58.0, 53.9, 52.9, 46.3, 28.4, 28.0, 23.9. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₂₅H₃₁N₂O₅ [M+H]⁺: 439.23; found: 439.32.

7.3.3 Synthesis of Inhibitor 10a.

**32** [294.93]

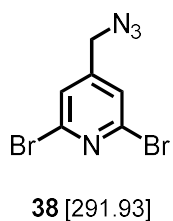
Methyl 2,6-dibromoisonicotinate (32). Citrazinic acid **20** (4.50 g, 29.0 mmol) and phosphorus(V) oxybromide (24.9 g, 87.0 mmol) were heated to 130 °C for 0.5 h and for additional 1.5 h at 150 °C. The mixture was cooled to 0 °C and MeOH (40 mL) was added carefully. The mixture was stirred for 15 h at rt and the solvent was removed under reduced pressure. Saturated NaHCO₃-solution (200 mL) was added and the mixture was neutralized with solid NaHCO₃. The solution was extracted with DCM (3 x 200 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 11:1). **32** (6.32 g, 21.4 mmol, 74%) was obtained as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.99 (s, 2H), 3.97 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 163.1, 141.6, 141.5, 126.8, 53.4. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₇H₉Br₂N₂O₂ [M+NH₄]⁺: 310.90; found: 310.95.

**33** [266.20]

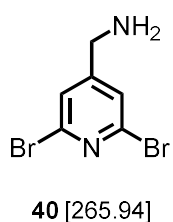
(2,6-Dibromopyridin-4-yl)methanol (33). *Method A:* Ester **32** (5.90 g, 20.0 mmol) was dissolved in MeOH (90 mL) and NaBH₄ (3.03 g, 80 mmol) was slowly added. The mixture was stirred for 3 h at 65 °C and was cooled afterwards to rt. 1 M HCl-solution (40 mL) was added and the solvent was concentrated to 10 mL volume. The solution was neutralized with solid Na₂CO₃ and the mixture was stirred for additional 2 h at rt.

The resulting precipitate was dissolved in DCM (50 mL) and diluted with H₂O (50 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 50 mL) and the combined organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 3:1). **33** (4.86 g, 18.2 mmol, 91%) was obtained as a white solid.

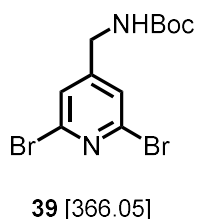
Method B: Carboxylic acid **37** (4.98 g, 17.7 mmol) was dissolved in THF (90 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. A solution of borane (1 M in THF, 54.9 mL, 54.9 mmol) was slowly added and the mixture was stirred for 16 h at rt. The mixture was diluted with H₂O (125 mL) and a pH of 9 was adjusted with a 3 M NaOH-solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 250 mL) and the combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 4:1). **33** (3.96 g, 14.8 mmol, 84%) was obtained as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.61 (m, 2H), 5.62 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.54 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 158.9, 139.7, 124.6, 60.5. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₆H₉Br₂N₂O [M+NH₄]⁺: 282.90; found: 282.96.



4-(Azidomethyl)-2,6-dibromopyridine (38). **33** (4.40 g, 16.6 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (40 mL) and phosphorus tribromide (1.9 mL, 19.7 mmol) was added. The mixture was stirred for 3 h at 40 °C and was cooled afterwards to rt. Saturated NaHCO₃-solution (100 mL) was added and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 100 mL). The combined organic layer was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in DMF (40 mL) and sodium azide (2.14 g, 33.0 mmol) was added. The mixture was stirred for 18 h at rt and was diluted with H₂O (80 mL). The solution was extracted with EtOAc (3 x 80 mL) and the combined organic layer was washed with brine. The solution was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 10:1). **38** (3.19 g, 10.9 mmol, 66%) was obtained as a light-yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.72 (s, 2H), 4.60 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 151.5, 140.1, 126.2, 50.8. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₆H₈Br₂N₅ [M+NH₄]⁺: 307.91; found: 307.95.

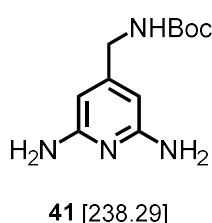


4-(Aminomethyl)-2,6-dibromopyridine (40). **38** (0.490 g, 1.68 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and tin(II) chloride (0.796 g, 4.20 mmol) was added at 0 °C. The mixture was stirred for 5 h at rt and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was suspended in 3 M NaOH-solution (40 mL) and was saturated with solid sodium chloride. The aqueous solution was extracted with CHCl₃ (3 x 30 mL) and the combined organic layer was dried over MgSO₄, filtered and und concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 10:1). **40** (0.313 g, 1.18 mmol, 70%) as a yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.68 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 2.04 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 161.2, 140.2, 126.41, 44.3. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₆H₇Br₂N₂ [M+H]⁺: 263.89; found: 264.92.

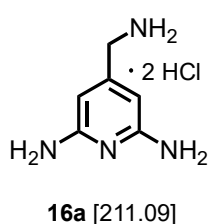


Tert-butyl((2,6-dibromopyridin-4-yl)methyl)carbamate (39). **Method A:** **38** (2.73 g, 9.35 mmol) was dissolved in THF (30 mL) and a solution of trimethylphosphine (1 M in THF, 10.3 mL, 10.3 mmol) was added at 0 °C. After 3 h stirring at rt, a solution of Boc₂O (2.45 g, 11.2 mmol) in THF (9 mL) was dropwise added at 0 °C and the mixture was stirred for additional 2 h. 1 M phosphate buffer (pH 7, 50 mL) was added to the mixture and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 70 mL). The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 6:1). **39** (1.72 g, 4.67 mmol, 50% over 2 steps) was obtained as a yellow solid.

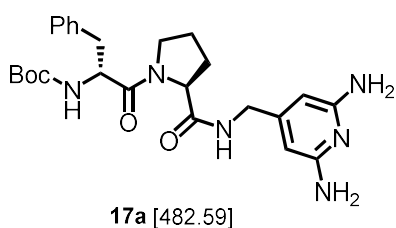
Method B: Amine **40** (0.293 g, 1.10 mmol) was dissolved in DCM (3 mL). Triethylamine (0.28 mL, 2.00 mmol) and a solution of Boc₂O (0.262 mg, 1.20 mmol) in DCM (2 mL) were slowly added. The mixture was stirred for 3 h at rt and was diluted with H₂O (6 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 10 mL), the combined organic layer was dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 6:1). **39** (0.312 g, 0.852 mmol, 77%) was obtained as a yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.54 (s, 2H), 4.28 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 156.2, 155.7, 139.9, 125.5, 78.5, 41.7, 28.1. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₁₁H₁₅Br₂N₂O₂ [M+H]⁺: 364.95; found: 365.05.



Tert-butyl((2,6-diaminopyridin-4-yl)methyl)carbamate (41). Compound **39** from method A (1.00 g, 2.73 mmol), 25% (w/v) aqueous ammonia solution (8.2 mL, 109 mmol), copper(I) oxide (39 mg, 0.273 mmol), potassium carbonate (76 mg, 0.546 mmol), DMEDA (29.4 μL, 0.273 mmol) was dissolved in ethylene glycol (6 mL) and stirred for 16 h at 60 °C. The mixture was extracted with EtOAc (3 × 25 mL) and was washed with brine. The combined organic layer was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH, 9:1 + 1% (v/v) NEt₃). **41** (0.410 g, 1.72 mmol, 63%) was obtained as a yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.16 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.29 (s, 4H), 3.82 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 158.6, 155.6, 151.2, 93.5, 77.6, 42.8, 28.2. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₁₁H₁₉N₄O₂ [M+H]⁺: 239.15; found: 239.16.

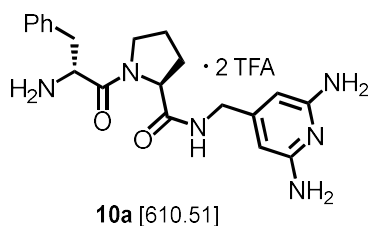


4-(Aminomethyl)pyridine-2,6-diamine · 2 HCl (16a). **41** (330 mg, 1.39 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (5 mL) and a 4 M solution of HCl in THF (7 mL) was added. The mixture was stirred for 3 h at rt. The solvent was removed under reduced pressure. **16a** (279 mg, 1.32 mmol, 95%) was obtained as a white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.1 (s, 1H), 8.75 (s, br, 3H), 7.53 (s, 4H), 5.95 (s, 2H), 3.82 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 151.8, 151.7, 94.2, 41.1. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₆H₁₁N₄ [M+H]⁺: 139.10; found: 139.16.



Boc-D-Phe-Pro derivative 17a. According to the general procedure **GP1** from section 6.2, compound **17a** was prepared using Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**, 250 mg, 0.690 mmol), amine **16a** (160 mg, 0.759 mmol), HOBt hydrate (116 mg, 0.759 mmol), EDC hydrochloride (146 mg, 0.759 mmol) and DIPEA (0.42 mL,

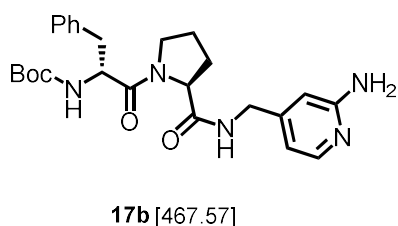
2.41 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH, 8:1). **17a** (259 mg, 0.537 mmol, 78%) was obtained as a yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.81 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.29-7.14 (m, 6H), 5.59-5.51 (m, 6H), 4.39-4.24 (m, 2H), 4.06-3.84 (m, 2H), 3.61-3.44 (m, 1H), 3.03-2.67 (m, 3H), 1.91-1.74 (m, 3H), 1.67-1.59 (m, 1H), 1.31 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 171.0, 170.3, 157.7, 155.4, 151.1, 138.4, 137.1, 129.3, 128.0, 126.4, 93.4, 78.3, 59.8, 53.8, 46.3, 41.4, 36.9, 29.0, 28.1, 23.9. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 483.27; found: 483.35.



D-Phe-Pro inhibitor **10a**. According to the general procedure **GP2** from section 6.2, inhibitor **10a** was prepared using **17a** (97.0 mg, 0.200 mmol) and TFA (2.0 mL). The crude product was purified by preparative HPLC. **10a** (96 mg, 0.157 mmol, 78%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.8 (s, 1H), 8.42-

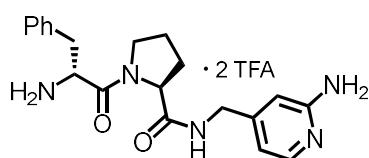
8.40 (m, 3H), 7.37-7.23 (m, 6H), 7.19 (s, 4H), 5.76 (s, 2H), 4.39-4.30 (m, 1H), 4.20-4.18 (m, 1H), 4.09-3.99 (m, 2H), 3.54-3.50 (m, 1H), 3.12 (dd, J = 13.1, J = 5.8 Hz, 1H), 2.97 (dd, J = 13.1, J = 9.0 Hz, 1H), 2.65-2.60 (m, 1H), 1.83-1.70 (m, 3H), 1.44 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 171.2, 167.0, 158.7 (q, J = 33.3 Hz), 158.2, 151.7, 134.5, 129.4, 128.5, 127.4, 116.6 (q, J = 296.5 Hz), 92.9, 60.0, 52.0, 46.6, 41.3, 36.7, 29.2, 23.7. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 383.22; found: 383.22.

7.3.4 Synthesis of Inhibitor 10b.



Boc-*D*-Phe-Pro derivative **17b**. According to the general procedure **GP1** from section 6.2, **17b** was prepared using *Boc*-*D*-Phe-Pro-OH (**15a**, 200 mg, 0.552 mmol), amine **16b** (commercially available from ChemPur, 136 mg, 0.607 mmol), HOBT hydrate (93 mg, 0.607 mmol), EDC hydrochloride (116 mg, 0.607 mmol)

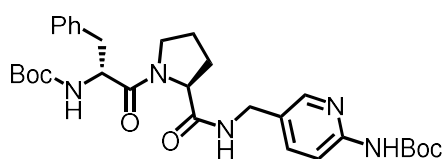
and DIPEA (0.24 mL, 1.38 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 1:3). **17b** (229 mg, 0.403 mmol, 73%) was obtained as a colorless solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.65 (s, 1H), 8.13-8.10 (m, 1H), 8.00 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.29-7.12 (m, 6H), 6.91-6.88 (m, 1H), 4.43-4.25 (m, 3H), 3.64-3.44 (m, 1H), 3.03-2.92 (m, 1H), 2.92-2.81 (m, 2H), 2.81-2.73 (m, 1H), 1.92-1.80 (m, 3H), 1.69-1.60 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.25 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 171.3, 170.5, 155.4, 152.6, 152.4, 150.2, 147.5, 137.2, 129.3, 128.0, 126.4, 116.3, 109.9, 79.4, 78.3, 59.9, 53.8, 46.4, 41.3, 36.9, 28.9, 28.0, 27.9, 23.8. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 568.32; found: 568.37.



10b [610.51]

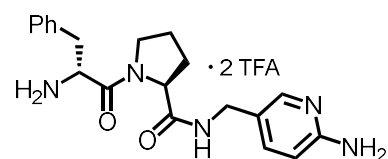
D-Phe-Pro inhibitor **10b**. According to the general procedure **GP2** from section 6.2, inhibitor **10b** was prepared using **17b** (171 mg, 0.301 mmol) and TFA (3.0 mL). The crude product was purified by preparative HPLC. **10b** (165 mg, 0.280 mmol, 92%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 13.9 (s, br, 1H), 8.52 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 8.36 (s, br, 3H), 8.13 (s, br, 2H), 7.86-7.85 (m, 1H), 7.37-7.28 (m, 3H), 7.25-7.23 (m, 2H), 6.78-6.77 (m, 1H), 6.73 (dd, J = 6.6 Hz, J = 1.6 Hz, 1H), 4.40-4.34 (m, 1H), 4.26 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 4.22-4.20 (m, 1H), 3.53-3.49 (m, 1H), 3.12 (dd, J = 13.2, J = 5.9 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 13.1, J = 8.7 Hz, 1H), 2.69-2.64 (m, 1H), 1.88-1.71 (m, 3H), 1.49-1.42 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 171.4, 167.0, 158.6 (q, J = 33.6 Hz), 158.2, 157.2, 154.0, 135.5, 134.4, 129.4, 128.5, 127.4, 116.4 (q, J = 296.0 Hz), 110.9, 109.5, 60.0, 52.0, 46.6, 41.3, 36.7, 29.2, 23.8. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 368.21; found: 368.23.

7.3.5 Synthesis of Inhibitor 10c.



17c [567.69]

Boc-D-Phe-Pro derivative 17c. According to the general procedure **GP1** from section 6.2, **17c** was prepared using Boc-D-Phe-Pro-OH (200 mg, 0.552 mmol), amine **16c** (commercially available from ChemPur, 136 mg, 0.607 mmol), HOBT hydrate (93 mg, 0.607 mmol), EDC hydrochloride (116 mg, 0.607 mmol) and DIPEA (0.24 mL, 1.38 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 1:4). **17c** (205 mg, 0.361 mmol, 65%) was obtained as a colorless solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 9.63 (s, 1H), 8.17-8.09 (m, 1H), 7.94 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.29-7.19 (m, 6H), 7.09-7.07 (m, 1H), 4.43-4.22 (m, 3H), 3.61-3.43 (m, 1H), 3.03-2.97 (m, 1H), 2.92-2.79 (m, 2H), 2.73-2.72 (m, 1H), 1.85-1.71 (m, 3H), 1.65-1.68 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.27 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 171.2, 170.5, 155.4, 152.6, 151.1, 146.8, 146.1, 137.2, 136.5, 129.3, 128.0, 126.4, 111.8, 79.4, 78.3, 59.9, 53.8, 46.4, 36.9, 29.0, 27.9, 23.9. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 568.32; found: 568.46.

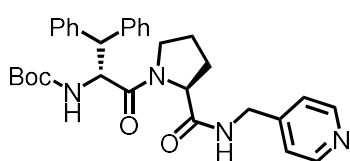


10c [610.51]

D-Phe-Pro inhibitor **10c**. According to the general procedure **GP2** from section 6.2, inhibitor **10c** was prepared using **17c** (135 mg, 0.238 mmol) and TFA (2.4 mL). The crude product was purified by preparative HPLC. **10c** (109 mg, 0.109 mmol, 82%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 8.40 (t, J = 5.9 Hz,

1H), 8.27 (s, br, 3H), 8.03 (s, br, 2H), 7.79-7.77 (m, 2H), 7.37-7.27 (m, 3H), 7.24-7.22 (m, 2H), 6.94-6.92 (m, 1H), 4.39-4.32 (m, 1H), 4.17-4.13 (m, 3H), 3.54-3.48 (m, 1H), 3.08 (dd, $J = 13.3, J = 6.1$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J = 13.2, J = 8.5$ Hz, 1H), 2.74-2.67 (m, 1H), 1.84-1.70 (m, 3H), 1.47-1.40 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 171.2, 167.0, 158.6$ (q, $J = 34.4$ Hz), 153.4, 143.7, 134.4, 133.2, 129.4, 128.5, 127.4, 123.5, 116.2 (q, $J = 294.3$ Hz), 113.4, 60.0, 52.0, 46.6, 38.3, 36.6, 29.1, 23.7. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 368.21; found: 368.25.

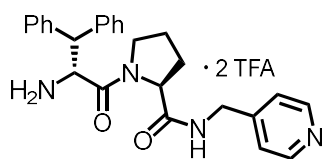
7.3.6 Synthesis of Inhibitor 11.



17d [528.65]

Boc-D-DiPhe-Pro derivative 17d. According to the general procedure **GP1** from section 6.2, **17d** was prepared using Boc-D-DiPhe-Pro-OH (**15b**, 270 mg, 0.616 mmol), amine **16d** (commercially available from Sigma Aldrich, 47 μL , 0.677 mmol), HOBt hydrate (104 mg, 0.677 mmol), EDC hydrochloride (130 mg, 0.677 mmol) and

DIPEA (0.26 mL, 1.54 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH, 11:1). **17d** (246 mg, 0.465 mmol, 76%) was obtained as a colorless solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 8.47$ -8.46 (m, 2H), 8.04 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.41-7.39 (m, 2H), 7.31-7.16 (m, 11H), 7.09-7.07 (m, 1H), 5.13-5.08 (m, 1H), 4.39 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.96-3.93 (m, 1H), 3.74-2.68 (m, 1H), 3.13-3.07 (m, 1H), 1.80-1.69 (m, 2H), 1.56-1.42 (m, 2H), 1.18 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 172.0, 170.5, 156.1, 149.9, 148.8, 141.3, 141.2, 129.3, 128.9, 128.6, 127.2, 126.8, 122.2, 78.8, 59.9, 55.0, 53.2, 47.2, 41.5, 29.4, 28.5, 24.4$. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 529.28; found: 529.46.

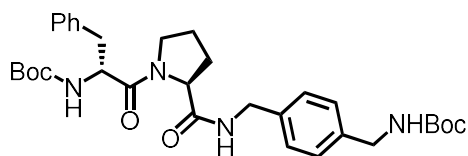


11 [656.58]

D-DiPhe-Pro inhibitor 11. According to the general procedure **GP2** from section 6.2, inhibitor **11** was prepared using **17d** (159 mg, 0.301 mmol) and TFA (3.0 mL). The crude product was purified by preparative HPLC. **11** (182 mg, 0.277 mmol, 92%) was obtained as a colorless solid.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 8.77$ (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 8.54 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.35 (s, br, 3H), 7.79 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.66-7.65 (m, 2H), 7.45-7.42 (m, 2H), 7.36-7.24 (m, 6H), 5.02 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.53 (dd, $J = 17.6, J = 6.3$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J = 17.6, J = 5.7$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.61-3.57 (m, 1H), 2.93-2.88 (m, 1H), 1.77-1.68 (m, 2H), 1.57-1.48 (m, 1H), 1.29-1.22 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 171.3, 167.1, 158.4$ (q, $J = 35.0$ Hz), 157.6, 143.0, 138.4, 137.5, 129.0, 128.9, 128.3, 127.6, 127.5, 123.9, 116.2 (q, $J = 293.8$ Hz), 60.0, 53.5, 53.3, 47.1, 41.5, 28.9, 23.6. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 429.23; found: 429.29.

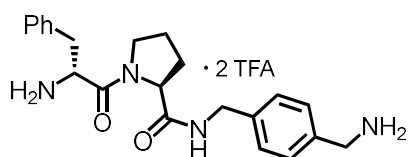
7.3.7 Synthesis of Inhibitor 46



48 [580.73]

Boc-D-Phe-Pro derivative 48. According to the general procedure **GP1** from section 7.2, **48** was prepared using Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**, 250 mg, 0.690 mmol), amine **47** (commercially available from Sigma Aldrich, 179 mg, 0.759 mmol), HOBT hydrate (116 mg, 0.759 mmol), EDC

hydrochloride (145 mg, 0.759 mmol) and DIPEA (0.30 mL, 1.72 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 1:4). **48** (199 mg, 0.343 mmol, 50%) was obtained as a colorless solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.70 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.90 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.33-7.15 (m, 10H), 4.38-4.01 (m, 6H), 3.60-3.43 (m, 1H), 2.99-2.70 (m, 3H), 1.84-1.55 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.26 (s, 9H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 171.0, 170.5, 155.7, 155.5, 138.4, 137.6, 137.2, 129.3, 128.0, 126.9, 126.8, 126.5, 78.3, 77.6, 59.9, 53.8, 46.4, 43.0, 41.6, 36.8, 29.0, 28.2, 28.0, 23.9 ppm. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 598.36; found: 598.59.

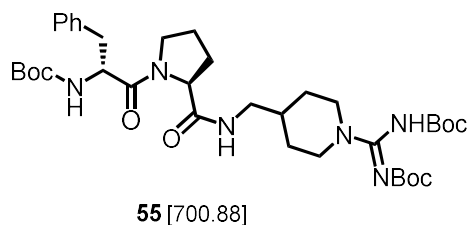


46 [608.53]

D-Phe-Pro inhibitor 46. According to the general procedure **GP2** from section 7.2, inhibitor **46** was prepared using **48** (175 mg, 0.301 mmol) and TFA (3.0 mL). The crude product was purified by preparative HPLC. **46** (186 mg, 0.273 mmol, 91%) was obtained as a colorless solid. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ =

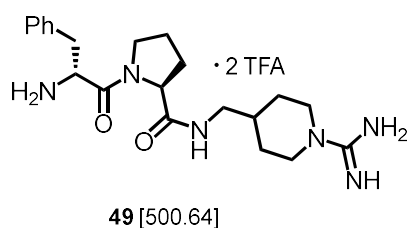
8.38-8.35 (m, 4H), 8.24 (s, br), 7.38-7.22 (m, 9H), 4.36-4.21 (m, 4H), 4.02-3.98 (m, 2H), 3.53-3.49 (m, 1H), 3.12-3.08 (dd, J = 13.2, 5.9 Hz, 1H), 3.01-2.95 (dd, J = 13.3, 8.6 Hz, 1H), 2.69-2.63 (m, 1H), 1.80-1.67 (m, 3H), 1.47-1.41 (m, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 170.9, 167.0, 158.4 (q, J = 33.7 Hz), 139.9, 134.5, 132.3, 129.5, 128.8, 128.6, 127.4, 127.0, 116.5 (q, J = 295.6 Hz), 60.0, 52.0, 46.7, 42.0, 41.6, 36.7, 29.4, 23.7. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 381.23; found: 381.30.

7.3.8 Synthesis of Inhibitor 49



Boc-D-Phe-Pro derivative 55. Amine **50** (1.50 g, 13.1 mmol) and benzaldehyde **51** (1.39 g, 13.1 mmol) were dissolved in CHCl_3 (500 mL). Magnesium sulfate (1.67 g, 13.9 mmol) was added and the mixture was stirred for 24 h at rt. Afterwards the precipitate was filtered and the solvent was removed

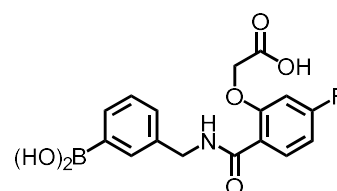
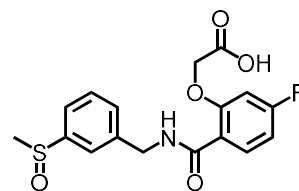
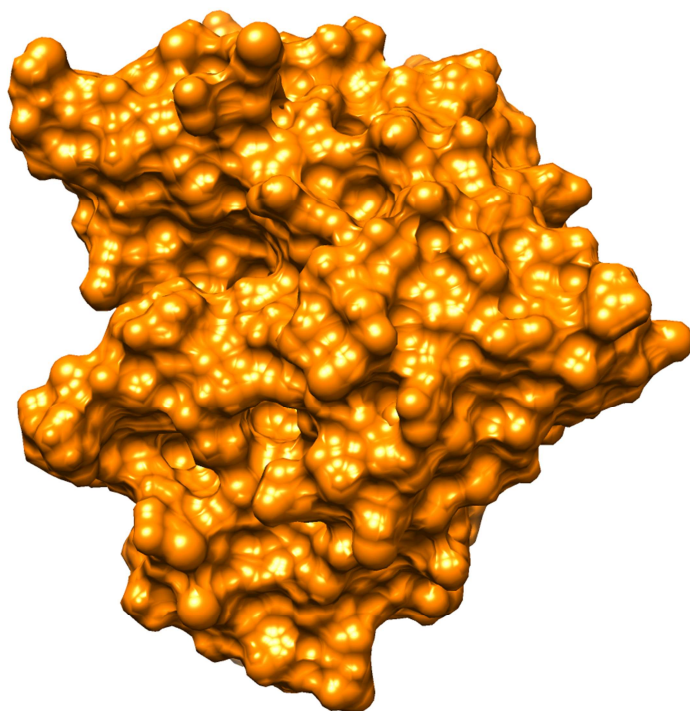
under reduced pressure. The residue was dissolved in toluene (90 mL) and bis-Boc-guanidine **52** (4.47 g, 14.4 mmol) was added. After stirring for 24 h at rt, the mixture was concentrated in vacuo and 1 M KHSO_4 -solution (35 mL) was added. The mixture was stirred for additional 5 h at rt. The aqueous layer was washed with Et_2O (50 mL) and was adjusted to pH 12 with 1 M NaOH-solution. The basic aqueous layer was extracted with DCM (3 x 100 mL), washed with brine (100 mL), dried over MgSO_4 and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and compound **54** (2.90 g, 8.14 mmol, 62% over 3 steps) was afforded as a white-yellow solid. **54** was directly used for the subsequent peptide synthesis of Boc-D-Phe-Pro derivative **55**. According to the general procedure **GP1** from section 7.2, **55** was prepared using Boc-D-Phe-Pro-OH (**15a**, 250 mg, 0.690 mmol), amine **54** (271 mg, 0.759 mmol), HOBt hydrate (116 mg, 0.759 mmol), EDC hydrochloride (146 mg, 0.759 mmol) and DIPEA (0.24 mL, 1.38 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/ EtOAc , 3:1 \rightarrow 1:6). **55** (290 mg, 0.414 mmol, 60%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.26 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.29-7.16 (m, 5H), 4.35-4.30 (m, 1H), 4.20-4.18 (m, 1H), 3.95-3.92 (m, 2H), 3.59-3.42 (m, 1H), 3.11-2.74 (m, 7H), 1.84-1.54 (m, 7H), 1.38 (s, 9H), 1.35 (s, 9H), 1.27 (s, 9H), 1.09-1.03 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 170.9, 170.5, 155.6, 155.5, 150.8, 138.5, 137.2, 129.3, 128.1, 126.5, 78.4, 78.0, 59.9, 59.7, 53.9, 46.4, 43.6, 36.8, 35.7, 29.0, 28.2, 28.0, 23.9. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 701.43; found: 701.50.



D-Phe-Pro inhibitor **49**: According to the general procedure **GP2** from section 7.2, inhibitor **49** was prepared using **55** (240 mg, 0.342 mmol) and TFA (3.5 mL). The crude product was purified by preparative HPLC. **49** (190 mg, 0.302 mmol, 88%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 8.33 (s, br, 3H),

7.84 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.39 (s, 4H), 7.36–7.28 (m, 3H), 7.23–7.18 (m, 2H), 4.37–4.30 (m, 1H), 4.15–4.12 (m, 1H), 3.83–3.79 (m, 2H), 3.52–3.45 (m, 1H), 3.11–3.06 (dd, J = 13.1, 5.8 Hz, 1H), 3.03–2.85 (m, 6H), 2.67–2.60 (m, 1H), 1.76–1.64 (m, 6H), 1.46–1.37 (m, 1H), 1.13–1.01 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 170.8, 166.8, 158.4 (q, J = 35.1 Hz), 155.6, 134.4, 129.4, 128.5, 127.4, 115.9 (q, J = 293.2 Hz), 59.9, 52.0, 46.6, 45.0, 43.3, 36.7, 35.0, 29.4, 28.8, 28.7, 23.6. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 401.27; found: 401.36.

Teil 2 – Aldose-Reduktase



Dieser Teil der Doktorarbeit beinhaltet die Ergebnisse zur Synthese von Inhibitoren der Aldose-Reduktase in den Kapiteln 8-12.

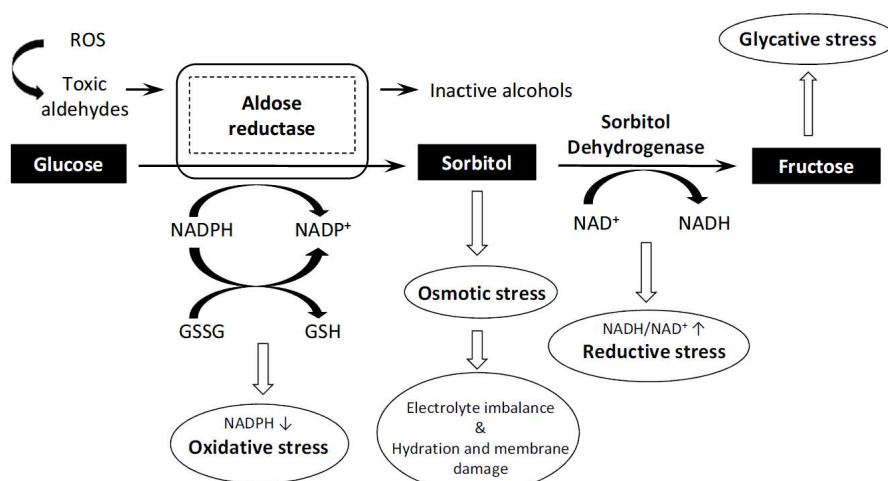
Hinweis: Abbildungen, Schemata sowie Molekülstrukturen von chemischen Verbindungen sind in diesem Teil der Arbeit neu nummeriert (jeweils beginnend mit 1).

8 Einleitung

8.1 Funktion und Struktur der humanen Aldose-Reduktase (ALR2)

8.1.1 Funktion von ALR2 im Polyol-Stoffwechselweg

Bei dem Enzym ALR2 handelt es sich um ein Mitglied der Aldo-Keto-Reduktase Familie, das mit dem Cofaktor NADPH toxische Aldehyde zu seinen inaktiven Alkoholen reduziert. Parallel zur Entfernung toxischer Aldehyde katalysiert ALR2 nach Schema 1 den ersten Schritt des Polyol-Stoffwechselweges von Glukose zu Sorbitol.¹¹⁶ Dabei kann eine erhöhte Anreicherung von Sorbitol osmotischen Stress auslösen, der zu einem Ungleichgewicht des Elektrolythaushalts sowie zu Membranschäden führt. Weiterhin kann durch einen verminderten NADPH-Spiegel oxidativer Stress in den Zellen entstehen. Wird übermäßig NADPH durch ALR2 unter Bildung von NADP⁺ verbraucht, kann über die Glutathion Reduktase nicht genügend Glutathion (dient als Antioxidans) erzeugt werden, um den oxidativen Stress zu unterbinden. Des Weiteren kann eine vermehrte Sorbitolkonzentration im Folgeschritt ein erhöhtes NADH/NAD⁺-Verhältnis entstehen, das zu reduktiven Stress führt. Hierbei wird durch die Sorbitol Dehydrogenase Fructose und NADH generiert.¹¹⁷ Während NADH über die NADH Oxidase reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bildet und diese wiederum beispielsweise die Membran von Mitochondrien angreifen können, führen Phosphorylierungen der Fructose zu glykosylierendem Stress und damit auch die Erzeugung weiterer ROS.¹¹⁸



Schema 1: Polyol-Stoffwechselweg und die entsprechenden Folgereaktionen bei Diabetes erkrankten Menschen. Schema ist entnommen aus Grewal et al.¹¹⁷

Aufgrund der relativ geringen Affinität von Glukose gegenüber ALR2 spielt der Polyol-Stoffwechselweg eine untergeordnete Rolle. Der größte Teil der Glukose wird hauptsächlich durch die Hexokinase phosphoryliert. Sobald allerdings eine Hyperglykämie d.h. eine hohe Glukosekonzentration vorliegt, erfolgt eine deutlich vermehrte Metabolisierung über den Polyol-Stoffwechselweg, sodass bis zu einem Drittel des gesamten Glukoseumsatzes hierüber erfolgt.¹¹⁹ Diese hyperglykämischen Zustände lassen sich in Zellen Diabetes erkrankter Personen feststellen, da die Regelung der Glukosekonzentration durch den Insulinmangel oder der verminderten Insulinwirkung gestört ist.¹¹⁷

8.1.2 Struktureller Aufbau von ALR2

ALR2 ist ein monomeres Enzym mit 316 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa. Das zentrale Faltungsmotiv ist eine *TIM-barrel* Struktur, die acht parallel geordneten β -Faltblättern besitzt, welche von acht α -Helices umgeben ist.¹²⁰ Im aktiven Zentrum befinden sich zum einen die relativ starre Anionenbindetasche, welche aus Tyr48, His110, Trp111 und dem gebundenen Cofaktor NADP⁺ besteht. Damit ist sie in der Lage negativ geladene bzw. polarisierte Gruppen über Wasserstoffbrückenbindungen zu fixieren (Abb. 1). Zum anderen gibt es noch die flexible transiente Spezifitätstasche, die durch die Seitenketten Leu300 und Phe122 verschlossen wird. Diese Aminosäuren dienen als *gatekeeper* und können durch eine Konformationsänderung bei der Bindung eines Liganden geöffnet werden.¹²¹

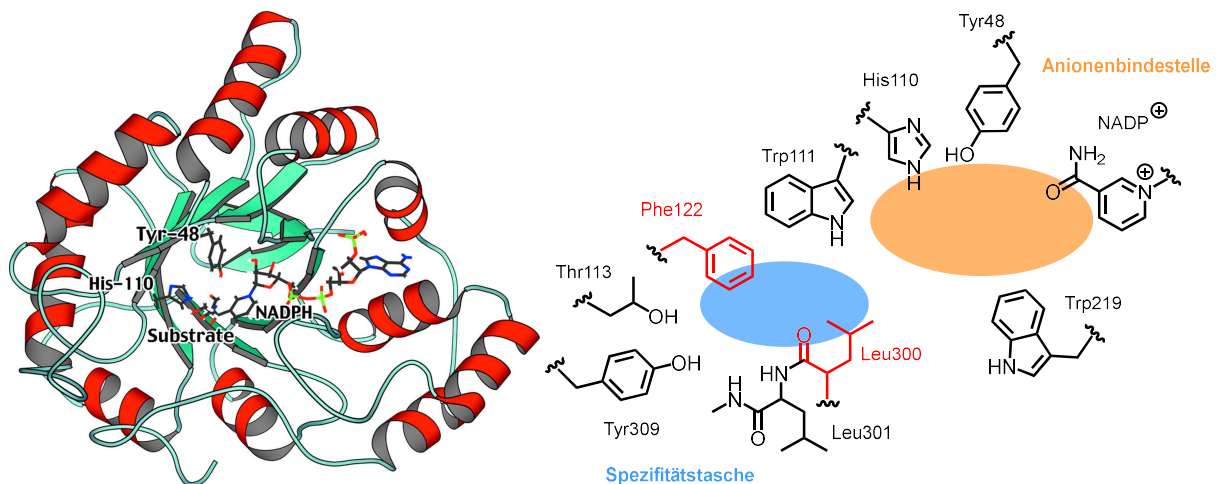


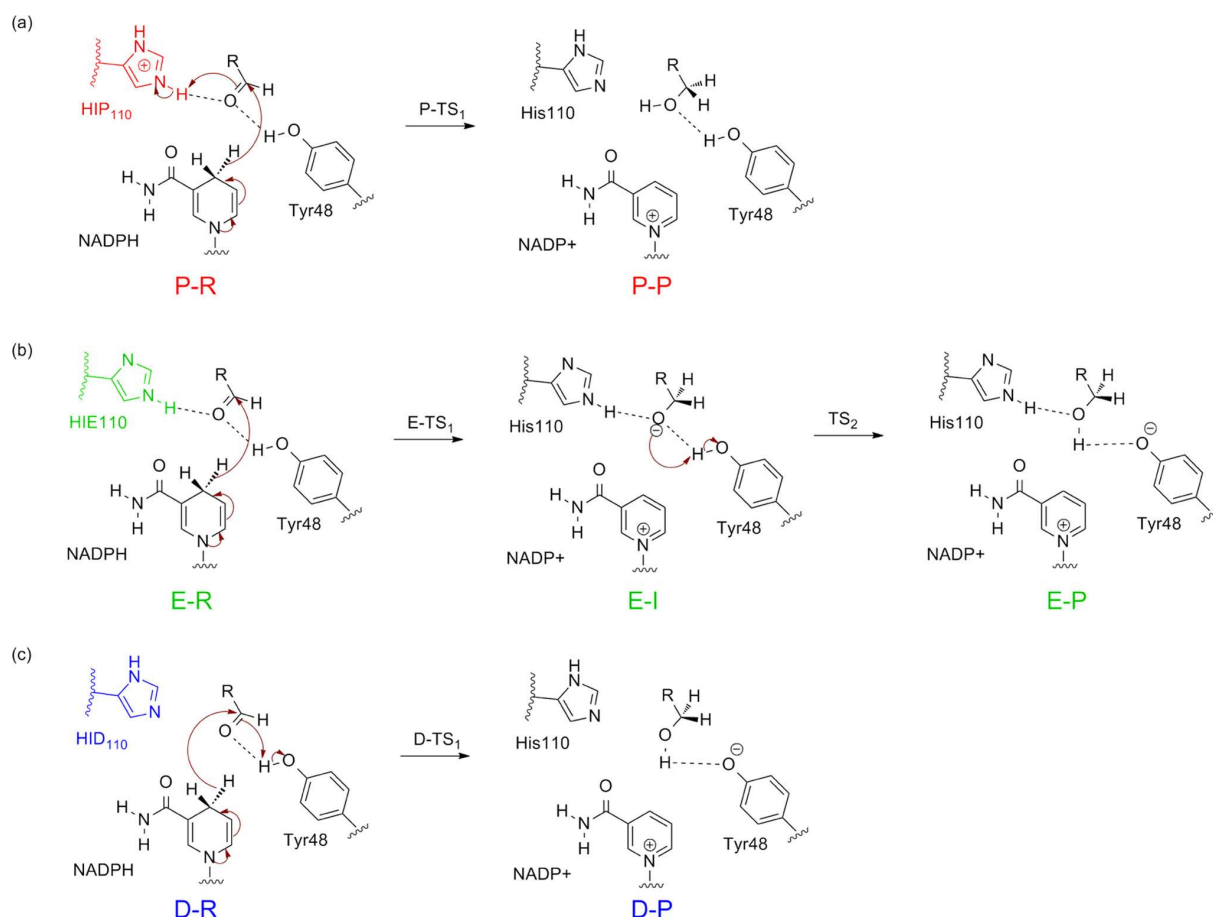
Abb. 1: Links ist die *TIM-barrel* Struktur von ALR2 im Komplex mit Glycerinaldehyd in Gegenwart von NADPH (reduzierte Form) dargestellt bestehend aus acht β -Faltblättern (grün) und acht α -Helices (rot), entnommen aus Várnai *et al.*¹²² Rechts wird das aktive Zentrum von ALR2 mit dem Cofaktor NADP⁺ (oxidierte Form, partiell abgeschnitten) gezeigt.¹²¹ Die blaue Ellipse symbolisiert die Spezifitätstasche, während das orangefarbene Zentrum die Anionenbindetasche andeutet.

8.1.3 Katalysemechanismus

Der Reaktionsmechanismus der Aldose-Reduktase ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach Schema 2 existiert bisher nur ein allgemeiner Mechanismus, der über zwei Schritte abläuft, in der zu Beginn ein Hydrid-Transfer von NADPH auf die Carbonylgruppe des Aldehyds stattfindet. Anschließend erfolgt ein Protonentransfer durch einen Protonendonator, um den Alkohol zu generieren. Trotz der Akzeptanz dieses allgemeinen Mechanismus ist nicht bekannt, ob es sich tatsächlich, um eine zweistufige oder eine konzertierte Reaktion handelt. Hierbei ist ebenfalls ungeklärt, ob Tyr48 oder His110 als Protonendonator dient. In der Literatur wird die Protonenübertragung hauptsächlich über Tyr48 aufgrund von Ergebnissen aus kristallographischen Analysen sowie Mutationsstudien beschrieben.^{123–125} Werden jedoch die pK_a -Werte bezüglich der funktionellen Gruppen des Tyrosins ($pK_a = 10$) und Histidin ($pK_a = 6-7$) verglichen, so würde man auf der einen Seite zunächst vermuten, dass das Histidin sein Proton am wahrscheinlichsten abgeben würde. Auf der anderen Seite muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass in Nähe des Tyr48 sich das Aminosäurepaar Asp43- Lys77 befindet und durch Wasserstoffbrückenbindungen die Acidität der Phenolgruppe erhöht ($pK_a = 8.25$).^{124,126} Lee *et al.*¹²⁷ und Várnai *et al.*¹²² untersuchten bereits den Katalysemechanismus der Aldose-Reduktase anhand von quantenmechanischen und molekularmechanischen (QM/MM) Simulationen. Während Lee *et al.* einen konzertierten Mechanismus feststellten und His110 als Protonendonator bestimmen, so berichteten Várnai *et al.* einen stufenartigen Mechanismus, bei welcher die Abgabe des Protons durch Tyr48 bevorzugt war.^{122,127}

Eine weitere QM/MM-Studie zur Untersuchung des Katalysemechanismus wurde von Dréanic *et al.* durchgeführt, die zusätzlich den Protonierungszustand des His110 betrachtet haben.¹²⁶ In Abhängigkeit dieses Zustandes sind verschiedene Reaktionsmechanismen nach Schema 2 vorstellbar. Im Falle der Mechanismen von HIP (Schema 2a) sowie HID (Schema 2c) handelt es sich um einstufige Prozesse. Während in Schema 2a HIP als Protonendonator in **P-R** fungiert und Tyr48 mit seiner Phenol-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Komplex **P-P** aufbaut, wird in Schema 2c das Proton von Tyr48 abgegeben, nachdem der Hydridtransfer durch NADPH in **D-R** erfolgt ist. HID greift nicht mit seinem N_δ -Proton im Mechanismus ein und bleibt somit unreaktiv. Der Reaktionsmechanismus in Schema 2b verläuft hingegen über zwei Stufen. Dabei findet die Protonenübertragung auch durch Tyr48 zu **E-P** statt, bei der das N_δ -Proton die tetraedrische Zwischenstufe **E-I** sowie den Protein-Ligand-Komplex **E-P** über eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisieren kann.¹²⁶

Teil 2 – Aldose-Reduktase: Einleitung



Schema 2: Vorgeschlagene Katalysemechanismen von ALR2 im Komplex mit Glycerinaldehyd bei verschiedenen Protonierungszuständen von His110. (a) HID (N_δ protoniert), (b) HIE (N_ε protoniert), (c) HIP (N_δ und N_ε protoniert). Schema ist entnommen aus Dréanic *et al.*¹²⁶

Dréanic *et al.* konnten in ihren Simulationen zeigen, dass mit HIP (protoniert in N_δ und N_ε-Position) für His110 eine durchschnittliche Aktivierungsenergie von $27.2 \pm 9.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ besteht und für den Fall von HIE eine durchschnittliche Aktivierungsenergie von $69.9 \pm 4.2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Ergebnisse zeigen, dass der Katalysemechanismus des HIE-Modells weniger Energie für die Aktivierung des Übergangszustandes benötigt, jedoch favorisieren die Autoren mehr die Resultate des HIP-Modells, da dieses gut mit den experimentellen Daten (Aktivierungsenergie von $61.9 \text{ kcal mol}^{-1}$) aus den Kinetikmessungen von Grimshaw *et al.*¹²⁸ übereinstimmt.¹²⁶ Folglich ist es am wahrscheinlichsten, dass Tyr48 als Protonendonator agiert.

8.2 Aldose-Reduktase-Inhibitoren in der Arzneimittelforschung

Bei Diabetes-Patienten können Langzeitkomplikationen wie Neuropathie, Retinopathie oder Nephropathie entstehen.¹²⁹ Der Blutzuckerspiegel lässt sich zum jetzigen Stand gut kontrollieren, jedoch ist es immer noch nicht möglich das Auftreten eines hyperglykämischen Zustandes vollständig

zu unterbinden. Um die Folgen eines erhöhten Glucose-Abbaus durch Aldose-Reduktase bei diabetisch bedingter Hyperglykämie zu verringern, ist die Inhibition dieses Enzyms in diesem Zusammenhang ein interessantes therapeutisches Ziel.¹³⁰

In der Vergangenheit wurde eine Reihe von Inhibitoren hergestellt, darunter gehört die in Abb. 2 dargestellte Tetramethylglutarsäure (**44**) eine der ersten Substanzen mit nennenswerter Hemmung der Aldose-Reduktase.¹¹⁷

Die darin enthaltene Carbonsäurestruktur war für viele darauffolgende Strukturen der Kernbaustein, da die funktionelle Gruppe unter physiologischen Bedingungen gut in der Anionenbindetasche bindet.

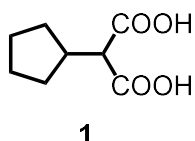


Abb. 2: Tetramethylglutarsäure (**1**) ist einer der ersten ALR2-Inhibitoren.

Auf Basis dieses Motivs wurden viele weitere Inhibitoren hergestellt, die in Abb. 3 dargestellt sind. Aus dieser Klasse entstand 1992 auch der einzige zugelassene Wirkstoff Epalrestat (**2**) (Kinedak®, *ONO Pharmaceutical Co.*, Japan) auf dem Markt.⁷ Während Zenarestat (**3**) aufgrund toxischer Nebenwirkungen im Jahr 2001 aus den klinischen Studien in Phase III zurückgezogen wurde, ist die Prüfung von Zopolrestat (**4**) noch nicht abgeschlossen.¹³¹

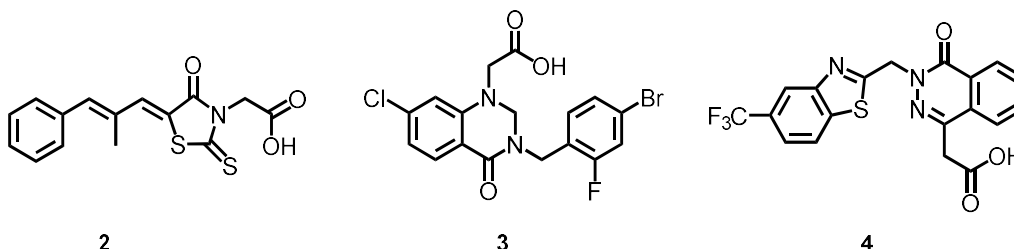


Abb. 3: ALR2-Inhibitoren mit freier Carbonsäuregruppe wie Epalrestat (**2**), Zenarestat (**3**) und Zopolrestat (**4**).

Ein Nachteil dieser Verbindungen ist, dass sie aufgrund des niedrigen pK_s -Werts ihrer Carbonsäurefunktion als deprotonierte Spezies eine schlechte Bioverfügbarkeit aufwiesen.¹³¹ Insbesondere lieferten sie schlechte Ergebnisse bei *in vivo* Tests, welche mit der geringen Zellpermeabilität zusammenhängt. Dieser Umstand führte zur Entwicklung von Inhibitoren auf Basis von Hydantoinen bzw. cyclischen Imiden, die eine wesentlich bessere Bioverfügbarkeit bei *in vivo* Tests zeigten.¹³² In Abb. 4 ist der erste Inhibitor Sorbinil **5** der Firma *Pfizer* dieser Klasse vorgestellt, der allerdings hypersensible Reaktionen auslöste.^{131,133} Eine weitere strukturähnliche Verbindung wäre Fidarestat **6**, das sich noch in klinischen Studien befindet.^{7,134}

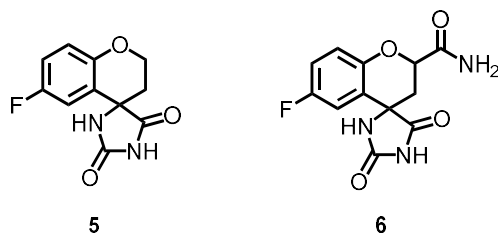
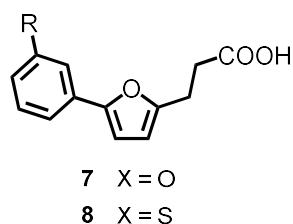


Abb. 4: Sorbinil (**5**) und Fidarestat (**6**) als ALR2-Inhibitoren mit Hydantoin-Grundgerüst.

8.3 Studien zum Mechanismus der transienten Spezifitätstasche

Wie in Abschnitt 8.1.2 berichtet, besteht die aktive Tasche der Aldose-Reduktase aus einer Anionenbindetasche und einer transienten Spezifitätstasche. Es gab bereits viele Ansätze der Darstellung von geeigneten Inhibitoren, die potente Eigenschaften besitzen und dabei beide Taschen gut ausfüllen. In einer Arbeit von *Eisenmann et al.* wurden die Inhibitoren **7** (2-Phenylfuran-Derivat) und **8** (2-Phenylthiophen-Derivat) hergestellt, bei denen die Carboxyl-Ankergruppe in der Anionenbindetasche bindet, während der lipophile aromatische Rest die Öffnung der Spezifitätstasche zwischen Trp111 und Leu300 induziert.¹²⁹ In dieser Studie stellte sich heraus, dass vor allem elektronenarme Aromaten zur Stärkung der aromatischen π - π -Wechselwirkung mit Trp111 aufgrund der polarisierten Kontaktflächen beitragen. Insbesondere durch die Einführung der Nitrogruppen für die Verbindungen **7d** und **8d** konnten die potentesten Inhibitoren dieser Serien erzielt werden (Tabelle 1).¹²⁹

Tabelle 1: ALR2-Inhibitoren **7** und **8** auf Basis eines 2-Phenylfuran bzw. 2-Phenylthiophen-Grundgerütes.



Inhibitor	R	IC ₅₀ / μ M	Inhibitor	R	IC ₅₀ / μ M
7a	Me	5.7 \pm 0.9	8a	Me	4.9 \pm 0.7
7b	OMe	6.8 \pm 1.5	8b	OMe	5.4 \pm 0.9
7c	CF ₃	2.0 \pm 0.3	8c	CF ₃	1.9 \pm 0.23
7d	NO ₂	0.3 \pm 0.05	8d	NO ₂	0.2 \pm 0.03

Einen weiteren Einblick über die Bindungseigenschaften von Inhibitoren im Komplex mit ALR2 wurde in einer Studie von *Rechlin et al.* präsentiert, in welcher der Öffnungsmechanismus der transienten Spezifitätstasche genauer untersucht wurde.¹²¹ In Abb. 5 sind zwei Inhibitoren mit einem 2-Arylcarbamoylethoxyphenol-Grundgerüst dargestellt.

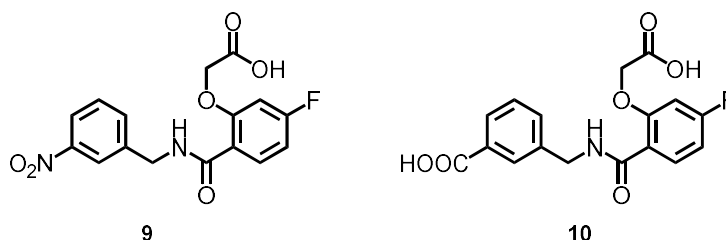


Abb. 5: Zwei isostere ALR2-Inhibitoren mit einer Nitrogruppe in *m*-Position des benzylichen Aromaten für Verbindung **9** und analog mit einer Carbonsäuregruppe für **10**.¹²¹

Während Inhibitor **9** in der Lage ist die Spezifitätstasche zu öffnen sowie eine π - π -Interaktion zwischen Trp111 und dem penetrierenden *meta*-substituierten Nitroaromaten ausbildet, bleibt diese Tasche bei der Bindung der isosteren Carbonsäuren-Verbindung **10** im geschlossenen Zustand (Abb. 6). Die Öffnung der transienten Spezifitätstasche beginnt mit dem Bruch des hydrophoben Kontakts zwischen Ala299 und Leu300, die zusätzlich in einer Peptid- und Seitenkettenrotation resultiert. Es ist bisher noch nicht ersichtlich, weshalb **9** diese Tasche öffnen kann und es mit Inhibitor **10** nicht möglich ist. Stattdessen ist der Benzylrest von **10** zu Trp219 gedreht. Da die transiente Spezifitätstasche bei der Bindung von **10** geschlossen bleibt, fehlt neben der π - π -Wechselwirkung mit Trp111 zusätzlich die direkte Wasserstoffbrücke zwischen der Essigsäuregruppe des Liganden zu Trp111. Hingegen erfolgt diese Bindung über eine Wasser-vermittelte Wechselwirkung. Letztendlich spiegelt sich dieser Zusammenhang auch in der Affinität wider, bei der Inhibitor **9** eine um drei Größenordnungen höhere Affinität zu **10** aufweist ($K_d = 0.018 \mu\text{M} \pm 0.003$ für **9** und $K_d = 36.2 \mu\text{M} \pm 11.4$ für **10**). MM-GBSA-Berechnungen bestätigten, dass für die geladene Carbonsäure-Gruppe ein höherer Preis an Desolvationsenergie zu bezahlen wäre als für die ungeladene Nitro-Gruppe, was den großen Affinitätsunterschied erklären würde. Möglicherweise vermeidet der Benzosäure-Rest den Aufwand zur Öffnung der transienten Spezifitätstasche und richtet sich dementsprechend bevorzugt zur Lösungsmittelseite aus.¹²¹

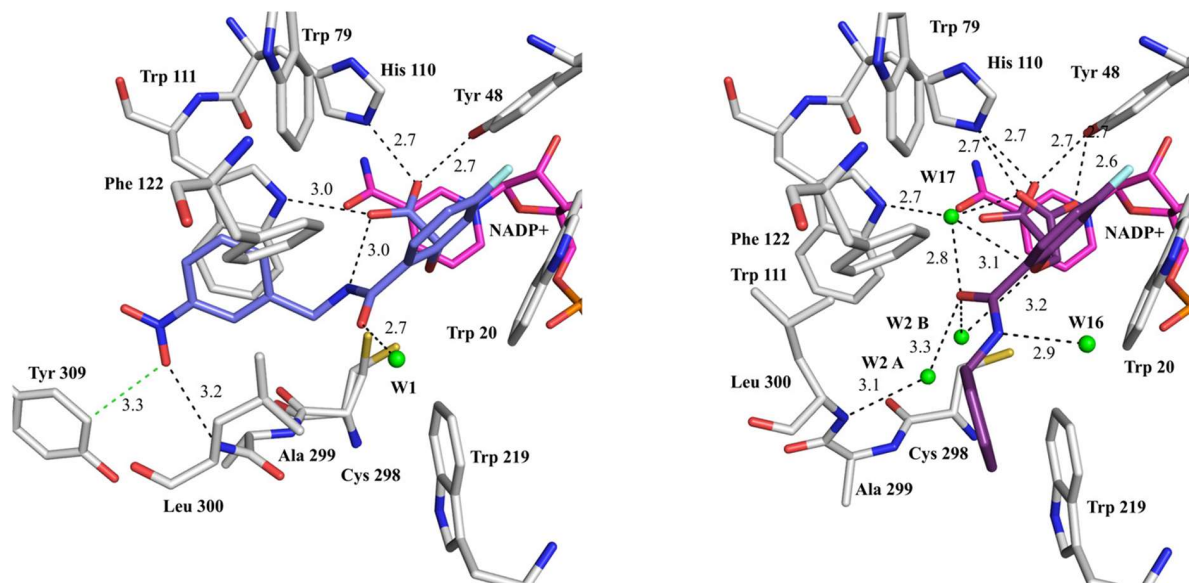


Abb. 6: Inhibitor **9** ist als blauer Ligand dargestellt, welcher die transiente Spezifitätstasche öffnet (links: PDB 4QBX), während diese im ALR2-Komplex mit dem violetten Liganden **10** im geschlossenen Zustand bleibt (rechts: PDB 4YS2). Beide Strukturen enthalten den Cofaktor NADP⁺, der in rosa gezeigt wird. Die Aminosäurereste sind in grau und Heteroatome sind als farbkodierte Atome dargestellt. Wassermoleküle besitzen eine grüne Farbe. Abbildung ist aus *Rechlin et al.* entnommen.¹²¹

9 Zielsetzung

Im Rahmen dieses Projektes sollten die Derivate **11** und **12** als potentielle Aldose-Reduktase-Inhibitoren mit dem gleichen 2-Arylcarbamoylphenoxyessigsäure-Grundgerüst ähnlich zu *Rechlin et al.* zur Untersuchung der transienten Spezifitätstasche hergestellt werden (Abb. 7). Dabei unterscheiden sich die Inhibitoren ausschließlich nur am *meta*-ständigen Benzylsubstituenten (Sulfoxid für **11** und Boronsäure für **12**).

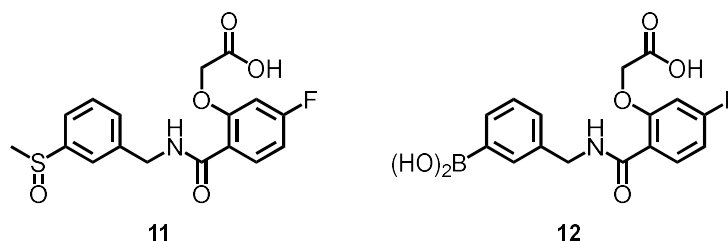


Abb. 7: ALR2-Inhibitoren **11** und **12**, die zur Untersuchung der transienten Spezifitätstasche dienen sollen.

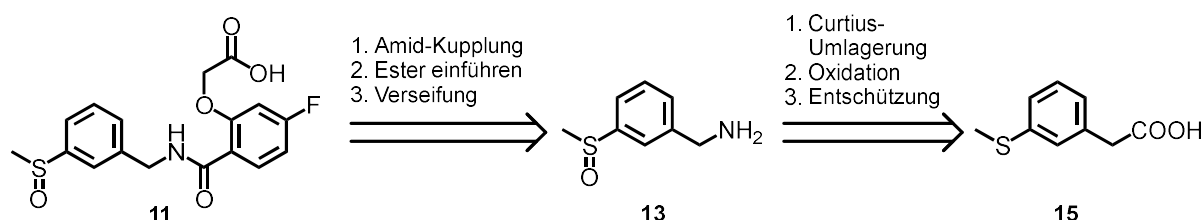
Auf Basis der Studie von *Rechlin et al.* können elektronenziehenden Substituenten an diesem Aromaten eine Öffnung der Spezifitätstasche auslösen, um somit dort stärkere π - π -Wechselwirkungen mit Trp111 einzugehen.¹²¹ Dieses Thema wurde zusätzlich in den Masterarbeiten von *Ley*¹³⁵ und *Hubert*¹³⁶ anhand von Mutanten der humanen Aldose-Reduktase vertieft. Um diesen Öffnungs-Mechanismus dieser transienten Bindetasche zu verstehen, wurden dementsprechend an Position 299, 300 sowie 301 Mutationen eingeführt (L300A, L301A und L300A/L301A).¹³⁵ Sowohl erste kristallographische Untersuchungen als auch ITC Experimente ergaben bisher keinen eindeutigen Zusammenhang bezüglich des Mechanismus. Zwar konnte bei den Komplexstrukturen von allen drei Mutanten mit **9** (L300A: PDB 6T3P, L301A, L300A/L301A) kein Unterschied im Vergleich zur Wildtyp-Struktur (PDB 4QBX) festgestellt werden, jedoch konnte für die jeweilige Komplexbildung von **10** mit der L300A- (PDB 6T7Q) und L301A-Mutante trotz der geschlossenen Geometrie des Peptidrückgrates ein leicht geöffneter Zustand der Spezifitätstasche durch die alternative Konformation des Ala300 vorgefunden werden (vollständige Öffnung in der Doppelmutante L300A/L301A).¹³⁶ So zeigten zumindest die Ergebnisse, dass im Allgemeinen die Rotation der Ala300-Mutanten für **9** und **10** geringer ausfällt, weil durch die weniger sperrige Seitenkette mehr Raum für zusätzliche Bindungen zugelassen werden. Dadurch ist die Energiebarriere zur Öffnung der transienten Spezifitätstasche erniedrigt, sodass die Aminosäuren sich weniger rotieren müssen.¹³⁶ Dennoch bleiben einige Fragen ungeklärt, weshalb **9** und **10** sich trotzdem unterschiedlich im Komplex verhalten und nicht denselben Mechanismus darstellen, obwohl die Verbindungen zueinander isoster sind.

Unterschiedliche Desolvatationseigenschaften können allerdings auch hierbei eine Rolle spielen. Dementsprechend sollten weitere Inhibitoren mit elektronenarmen Benzylresten wie **11** und **12** synthetisiert werden, um diese anhand von Kristallstrukturanalysen sowie ITC Experimenten zu untersuchen. Bisher besteht noch kein fester Zusammenhang zwischen den thermodynamischen Resultaten sowie den Kristallstrukturen, die es weiterhin zu lösen gilt.

10 Synthese

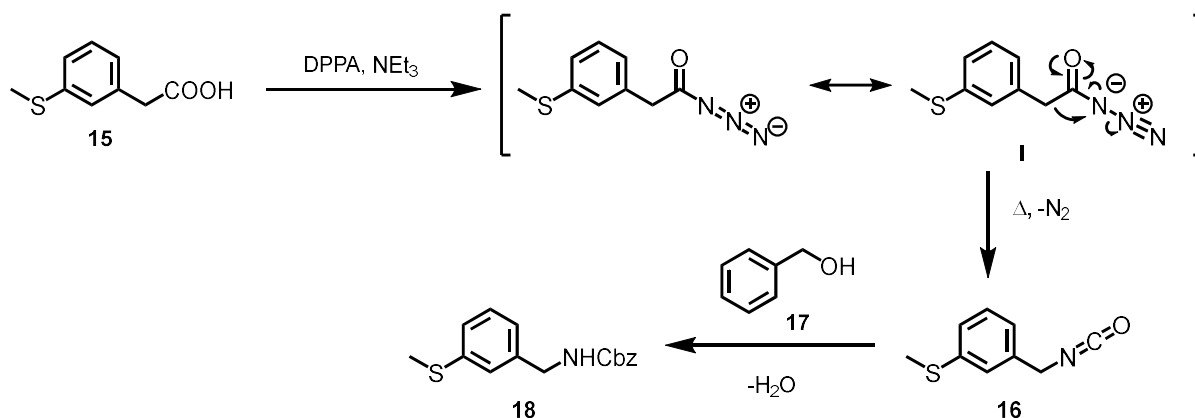
10.1 Darstellung von Inhibitor 11

Inhibitor **11** soll aus dem gleichen 2-Arylcarbamoylphenoxyessigsäure-Grundgerüst, wie bei *Rechlin et al.*¹²¹ verwendet, bestehen. In Schema 3 wird ein Retrosyntheseplan vorgestellt, der über sechs Stufen zur gewünschten Zielverbindung **11** führen soll. Dazu wird das Amin **13** benötigt, welches über eine Cbz-geschützte *one-pot Curtius-Umlagerung* mit anschließender Oxidation gebildet werden kann. Nach einer entsprechenden Entschützung kann mit 4-Fluorsalicylsäure (**14**, s. Schema 7) eine Kupplungsreaktion durchgeführt werden, bei der darauffolgend eine Einführung eines Esters erfolgt, welche in der letzten Stufe zur freien Carbonsäure **11** verseift wird.



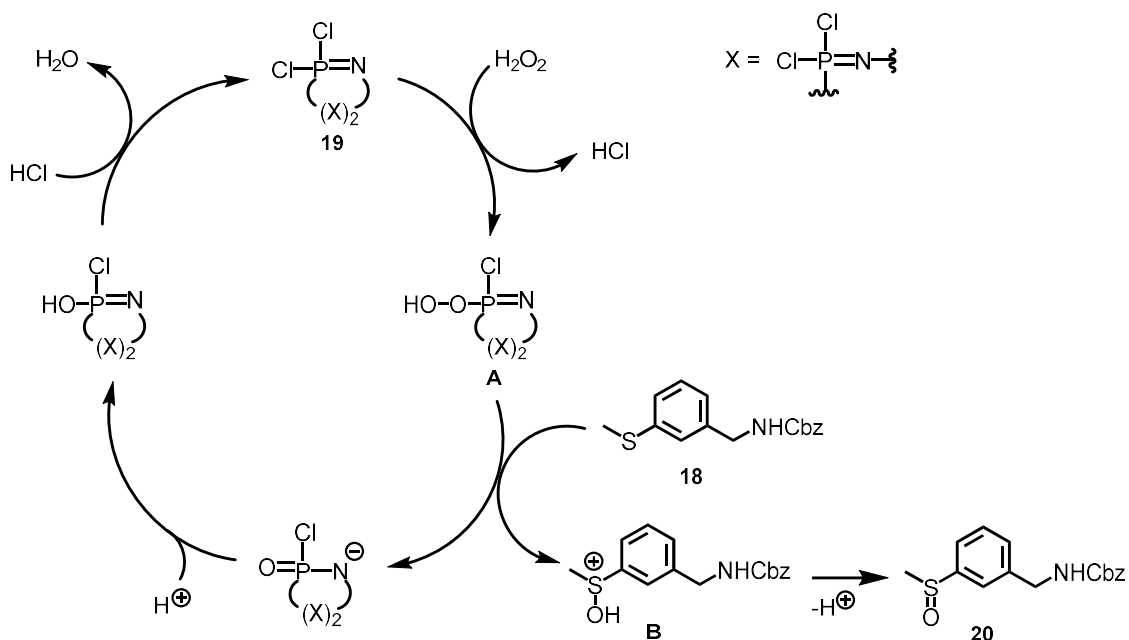
Schema 3: Retrosynthetischer Plan zur Darstellung von ALR2-Inhibitor **11** ausgehend von Phenylelessigsäure **15** über sechs Stufen.

In der ersten Stufe erfolgte nach Schema 4 eine *Curtius-Umlagerung* mit Phenylelessigsäure **15** in Gegenwart von Diphenylphosphorylazid (DPPA) die Bildung eines thermisch instabilen Acylazids **I**, das unter Freisetzung von Stickstoff zum Isocyanat **16** führte und darauffolgend mit Benzylalkohol (**17**) zum Cbz-geschützten Amin **18** reagierte.¹³⁷



Schema 4: Mechanismus der *Curtius-Umlagerung* von **15** zur Cbz-geschützten Verbindung **18**.^{137,138}

Im nächsten Schritt wurde das Sulfoxid **13** nach *Bahrami et al.* unter Verwendung von Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel und des Katalysators TAPC (**19**) in einer Reaktion frei von organischen Lösungsmittel generiert.¹³⁹ Bei TAPC (**19**) handelt es sich um ein cyclisiertes Hexachlortriphosphazen, das in Kombination mit Wasserstoffperoxid kontrolliert Sulfoxide bildet und dabei gute Ausbeuten in einer kurzen Reaktionszeit liefert. Außerdem soll auch laut den Autoren keine weitere Oxidation zum Sulfon als Nebenreaktion nicht stattfinden. Um eine optimale Ausbeute für Sulfoxide zu erhalten, wird ein Verhältnis von 1:1:0.1 (Sulfid:H₂O₂:TAPC) empfohlen. Sollen reine Sulfone erhalten werden, muss die Stoffmenge des Oxidationsmittels um den Faktor zwei erhöht werden.¹³⁹ Erwähnenswert ist auch, dass eine Rückreaktion zum Sulfid mit TAPC in Gegenwart von Kaliumiodid möglich ist. In Schema 5 wird ein vorgeschlagener Mechanismus der TAPC-katalysierten Oxidation zum Sulfoxid **20** präsentiert.¹³⁹



Schema 5: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der TAPC-katalysierten Oxidation mit H₂O₂ zu Verbindung **20** ausgehend vom Sulfid **18**.¹³⁹

Zunächst erfolgt der nukleophile Angriff von Wasserstoffperoxid auf TAPC unter Bildung des Zwischenprodukts **A**, das darauffolgend von Sulfid **18** angegriffen und das Sulfoniumion **B** erhalten wird. Im letzten Schritt wird ein Proton unter Erhalt des Sulfoxids **20** abgespalten.

Zwar konnte das gewünschte Produkt **20** hergestellt werden, jedoch konnte die Bildung des Sulfons **21** (s. Abb. 9 und 10) als Nebenprodukt nicht vermieden werden. Da die Umsetzung anhand der Dünnschichtchromatographie nicht vollständig abgelaufen war (maximal 50%), wurden weitere 0.15 Äquivalente Wasserstoffperoxid hinzugefügt und für eine Stunde gerührt. Allerdings führte dies nicht zu einer verbesserten Umsatzrate, sodass weitere 0.15 Äquivalente an Wasserstoffperoxid zugegeben wurden. Dementsprechend konnte die Sulfoxidbildung aufgrund des Überschusses an Peroxid nicht

mehr kontrolliert werden, was zu einer leichten Überoxidation zum Sulfon **21** führte. Trotz eines relativ unpolaren Elutionsmittelgemisches bei der säulenchromatographischen Kieselgelreinigung mit entsprechender langer und breiter Säule ($R_f = 0.18$; Cyclohexan/EtOAc, 1:7) mussten einige Mischfraktionen von Sulfoxid **20** mit Sulfon **21** verworfen werden, da die R_f -Werte wegen ihres ähnlichen Dipolmomentes sehr nahe beieinander lagen (Abb. 8).¹⁴⁰

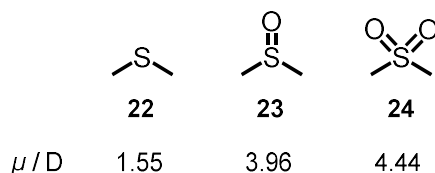


Abb. 8: Vergleich von Dipolmomenten μ anhand der Schwefelverbindungen Dimethylsulfid (**22**), Dimethylsulfoxid (**23**), Dimethylsulfon (**24**). Angaben sind in D (Debye).¹⁴⁰

Dementsprechend betrug die Ausbeute des reinen Sulfoxids **20** 40% (über zwei Stufen) ausgehend von Phenyllessigsäure **15**. Ein analytischer NMR-Nachweis der Mischfraktionen wird in Abb. 9 gezeigt, bei der das Sulfon **21** als Nebenprodukt festzustellen zu ist. Die Protonen der Methylgruppe des Sulfoxids **20** sind bei einer chemischen Verschiebung von 2.72 ppm zu finden, während die Protonen der analogen Methylgruppe des Sulfons **21** aufgrund ihrer geringeren Abschirmung eine etwas höhere chemische Verschiebung von 3.19 ppm aufweisen. Ebenfalls konnte die Masse des Sulfons im ESI(+) gefunden werden (Abb. 10).

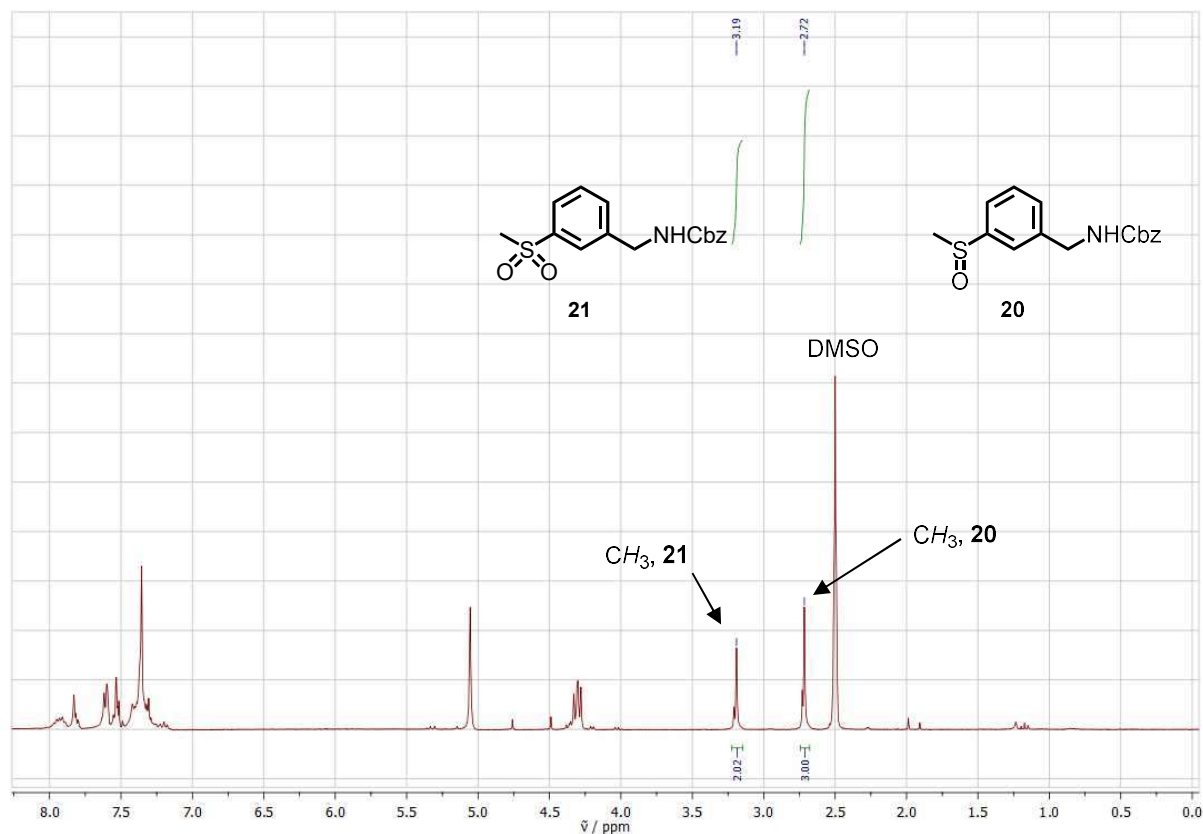


Abb. 9: ^1H NMR-Spektrum der Mischfraktionen aus Sulfoxid **20** und Sulfon **21** in $\text{DMSO}-d_6$. Die Protonen der jeweiligen Methylgruppe sind den entsprechenden Peaks zugeordnet. Es liegt ein Verhältnis von 3:2 (Sulfoxid **20**: Sulfon **21**) vor.

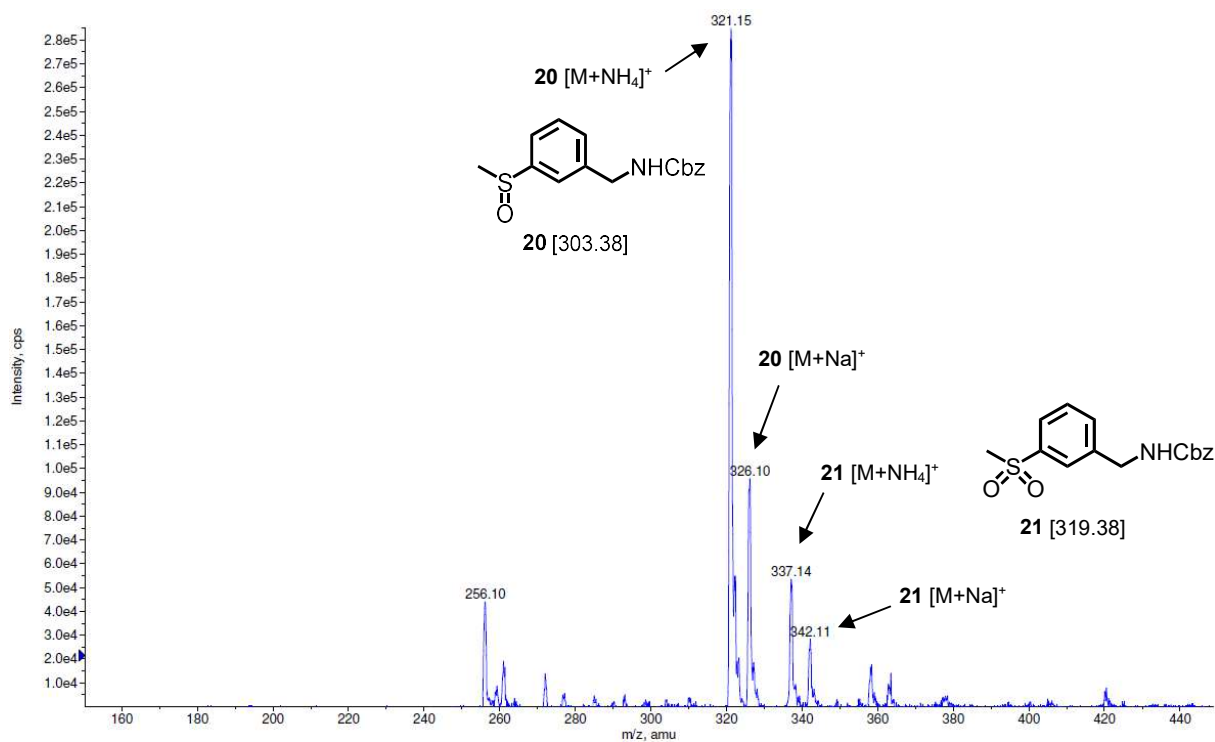


Abb. 10: ESI(+)-Massenspektrum der Mischfraktionen aus Sulfoxid **20** und Sulfon **21**.

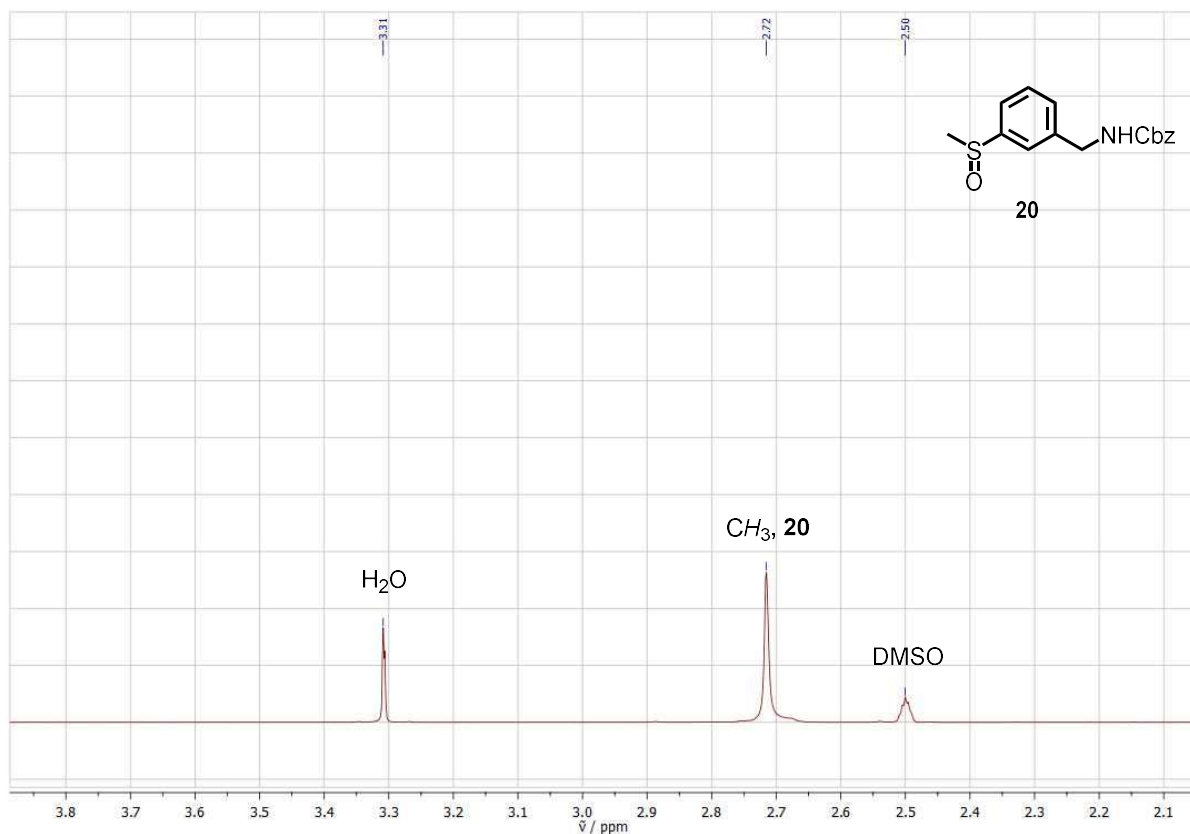


Abb. 11: Ausschnitt des ^1H NMR-Spektrums der reinen Fraktionen von Sulfoxid **20**. Es sind keine weiteren Protonen der Methylgruppe des Sulfons **21** bei 3.19 ppm wie in Abb. 9 festzustellen. Das Spektrum wurde in $\text{DMSO}-d_6$ aufgenommen und nur der dazugehörige H_2O -Peak des DMSO ist in der Umgebung der Methylgruppe zu sehen.

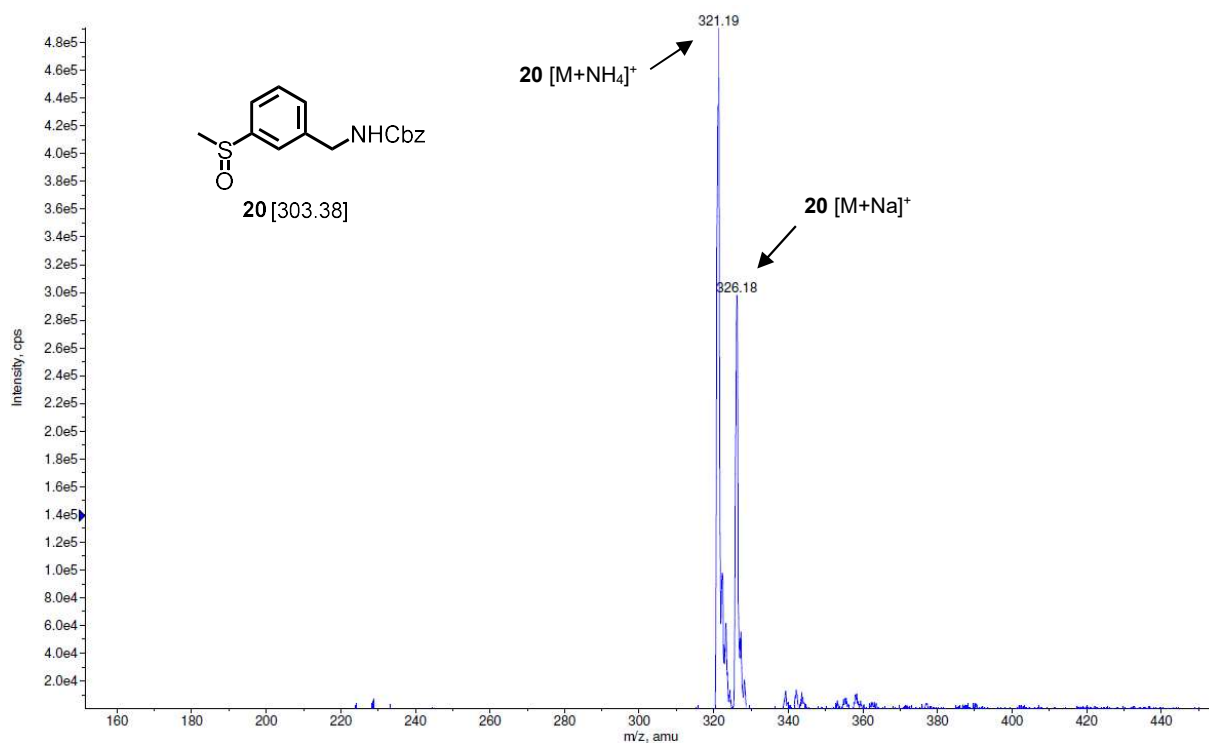
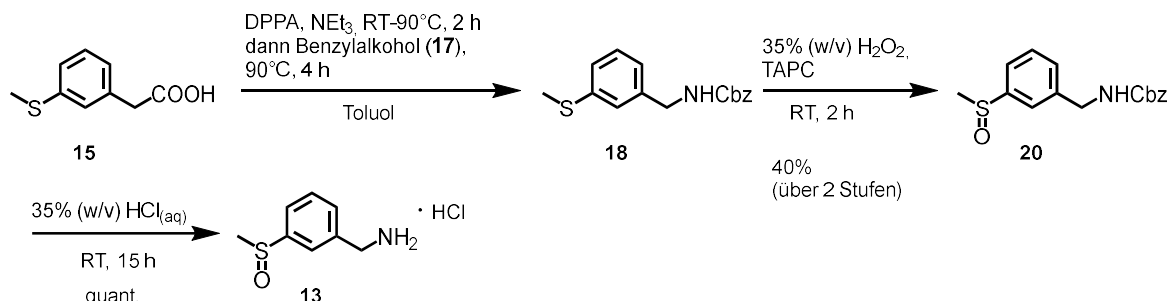


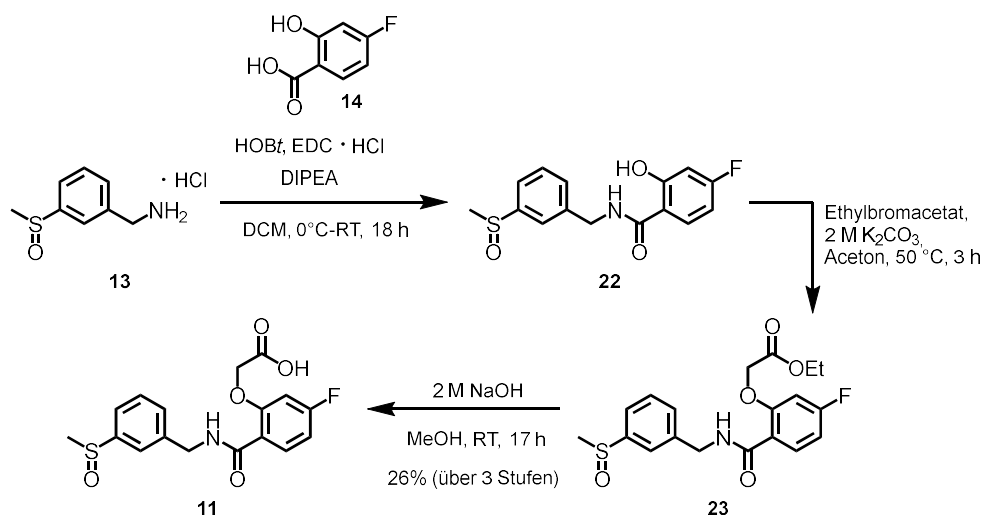
Abb. 12: ESI(+)-Massenspektrum der reinen Fraktionen von Sulfoxid **20** ohne das Nebenprodukt **21**.

In der zweistufigen Synthese nach einer *Curtius*-Umlagerung und Oxidation des Schwefels zum Sulfoxid **20** konnte im nachfolgenden Schritt die Entschützung unter stark sauren Bedingungen zum Amin **13** vorgenommen werden, die in quantitativen Ausbeuten erhalten wurden (Schema 6).



Schema 6: Darstellung desamins **13** als HCl-Salz über eine dreistufige Syntheseroute ausgehend von Phenyllessigsäure **15**.

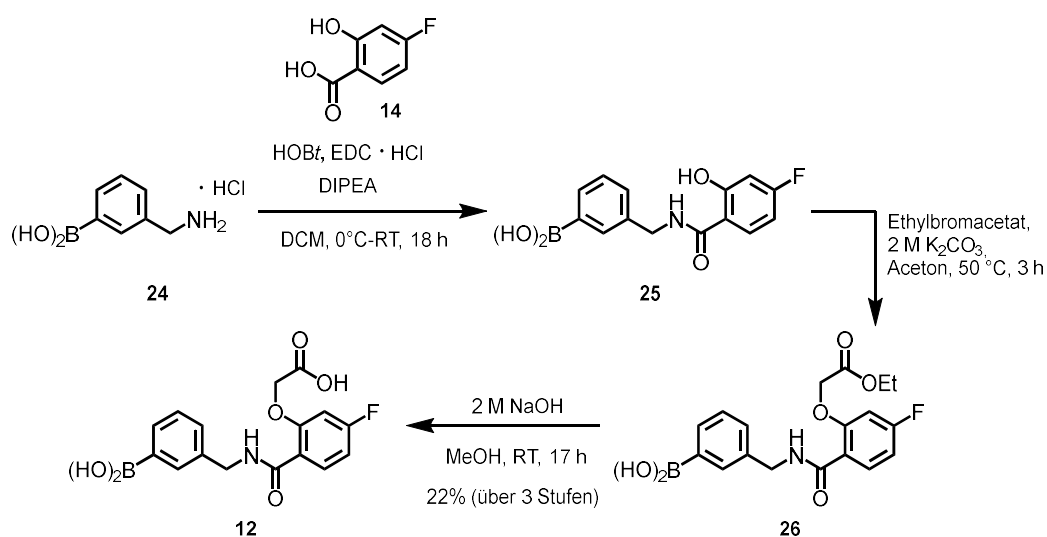
Nach Erhalt desamins **13** konnte eine Amidkupplung mit der kommerziell erhältlichen 4-Fluorsalicylsäure (**14**, ChemPur) zu **22** ähnlich zu Zandt *et al.* durchgeführt werden, um es für die Einführung des Esters zu nutzen. Hierbei wurde Ethylbromacetat als Elektrophil verwendet, das mit **22** eine Substitutionsreaktion einging und somit zum Ester **23** unter Freisetzung von Bromwasserstoff führte. **23** wurde schließlich zum gewünschten Inhibitor **11** verseift (Schema 7).¹⁴¹



Schema 7: Das aus Schema 22 synthetisierte Amin **13** ging eine Kupplungsreaktion zu **22** ein, welches in zwei weiteren Stufen zum Inhibitor **11** umgesetzt wurde. Die angegebene Ausbeute bezieht sich auf die gesamte Umsetzung der drei vorliegenden Stufen inklusiver Aufreinigung über präparativer HPLC.

10.2 Darstellung von Inhibitor 12

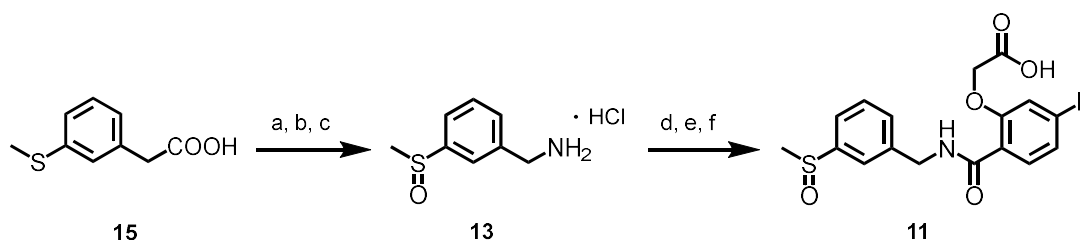
Da das Amin **24** mit der freien Boronsäure als HCl-Salz kommerziell erhältlich war (*ChemPur*), konnte **25** analog zur Darstellung von **22** aus Schema 7 nach einer Kupplungsreaktion hergestellt werden. Aufgrund der stark polaren Boronsäuregruppe konnte mit Verbindung **25** keine säulenchromatographische Aufreinigung durchgeführt werden. Da auch mittels präparativer HPLC nur geringe Mengen auf die *reverse phase* Säule aufgetragen werden und große Verluste bezüglich der Ausbeute des Produktes nach sich ziehen können, wurde **25** verunreinigt in den Ester **26** überführt. Schließlich wurde **26** zum Inhibitor **12** verseift, das über präparative HPLC aufgereinigt wurde (Schema 8).¹⁴¹



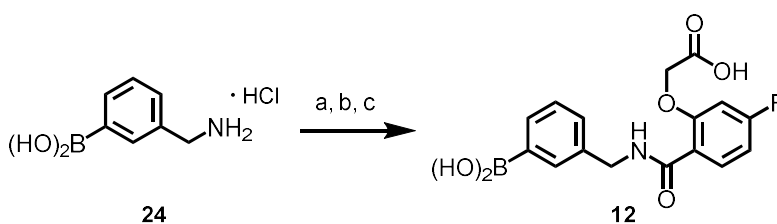
Schema 8: Synthese und Angabe der Ausbeute von Inhibitor **12** analog zur Darstellung von **11** aus Schema 7.

11 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten zwei ALR2-Inhibitoren mit einem 2-Arylcarbamoylphenoxyessigsäure-Grundgerüst erfolgreich synthetisiert werden. Dabei wurde für die Darstellung des Inhibitors **11** das Amin **13** via Cbz-geschützte *one-pot Curtius-Umlagerung* von Sulfid **15** und Oxidation der Sulfidgruppe mit anschließenden Abspaltung der CBz-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen hergestellt.^{137,139} In den darauffolgenden drei Stufen wurde eine Amidkupplung durchgeführt, bei der zunächst die Esterfunktionalität durch eine Substitutionsreaktion eingeleitet und mit einer Verseifung zum Inhibitor **11** abgeschlossen wurde (Schema 9).¹⁴¹ Über sechs Stufen wurde **11** mit einer Gesamtausbeute von 10% (nach präparativer HPLC-Aufreinigung der letzten Stufe) erhalten. Für die Darstellung des Inhibitors **12** wurde nach dem analogen Syntheseweg vorgegangen. Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Amin **24** (*ChemPur*) konnte über drei Stufen das Produkt **12** in einer Gesamtausbeute von 22% hergestellt werden (Schema 10).



Schema 9: a) DPPA, NEt₃, Toluol, RT-90 °C, 2 h dann Benzylalkohol (**17**), Toluol, 90 °C, 4 h; b) 35% (w/v) H₂O₂-Lsg., TAPC, RT, 2 h; c) 32% (w/v) HCl-Lsg., RT, 15 h, 40% (über 3 Stufen); d) 4-Fluorsalicylsäure (**14**), HOBt, EDC · HCl, DIPEA, 0 °C-RT, 18 h; e) Ethylbromacetat, 2 M K₂CO₃, Aceton, 50 °C, 3 h; f) 2 M NaOH, MeOH, RT, 15 h, 26% (über 3 Stufen).



Schema 10: a) 4-Fluorsalicylsäure (**14**), HOBt, EDC · HCl, DIPEA, 0 °C-RT, 18 h; b) Ethylbromacetat, 2 M K₂CO₃, Aceton, 50 °C, 3 h; c) 2 M NaOH, MeOH, RT, 17 h, 22% (über 3 Stufen).

Gegenstand kommender Forschung ist die Untersuchung der beiden Inhibitoren **11** und **12** bezüglich deren Fähigkeit die transiente Spezifitätstasche von ALR2 zu öffnen. Neben der mit diesen Verbindungen bereits durchgeführten Röntgenstrukturanalyse von A. Sandner (AG Klebe) werden in der näheren Zukunft **11** und **12** sowohl enzymkinetisch als auch thermodynamisch untersucht, um den Bindungsmodus und das Bindungsprofil dieser Liganden anhand der Daten aufklären zu können. Diese sollen mit einer Serie weiterer ALR2-Inhibitoren ähnlicher Struktur verglichen werden, um daraus

einen Trend herzuleiten, unter welchen Bedingungen die Spezifitätstasche öffnet und das Protein eine Konformationsänderung eingeht. Außerdem soll ein Vergleich dieser Resultate schließlich mit verschiedenen Mutanten der Aldose-Reduktase durchgeführt werden, die es ermöglichen den Öffnungsmechanismus genauer verstehen zu können. Erste Ergebnisse aus direkten ITC-Titrations zeigen, dass es sich bei beiden Inhibitoren um dreistellig nano-molare Binder handelt ($K_d = 620$ nM für **11** und $K_d = 310$ nM für **12**). In Abb. 13 sind die Komplexstrukturen der ALR2 mit den Inhibitoren **11** und **12** jeweils in der Umgebung der transienten Spezifitätstasche dargestellt. Auf der linken Seite wird Inhibitor **11** abgebildet, welcher zwei Konformationen besitzt und in der Anionenbindetasche Wasserstoffbrückenbindungen mit His110 sowie Trp111 ausbildet. Allerdings hat der benzyliche Aromat mit der freien Boronsäure fehlgeordnete Orientierungen und lässt sich nicht visuell in der Struktur erfassen. Anhand des Rückgrats um Leu300 wird dennoch deutlich, dass die transiente Spezifitätstasche sich im geschlossenen Zustand befindet und kein Raum zwischen den *gatekeepern* Phe122 und Leu300 entsteht. Auch Inhibitor **12** (Abb. 13, rechts) hat zwei Konformationen des Fluorsalicylsäure-Segments und ist in der Lage mit der Sulfoxidgruppe (Besetzung von 68%) die Spezifitätstasche zu öffnen (Besetzung des Leu300: 58% für I und 42% für II). Die Seitenkette des Leu300 rotiert entsprechend zur Seite (Konformation II) und ermöglicht damit ein paralleles π - π -stacking in einem Abstand von 3.6 Å zwischen dem benzylichen Aromaten von **12** und Trp111. Weiterhin ergeben sich hier ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen mit His110 sowie Trp111 über die Carbonsäure des Liganden.

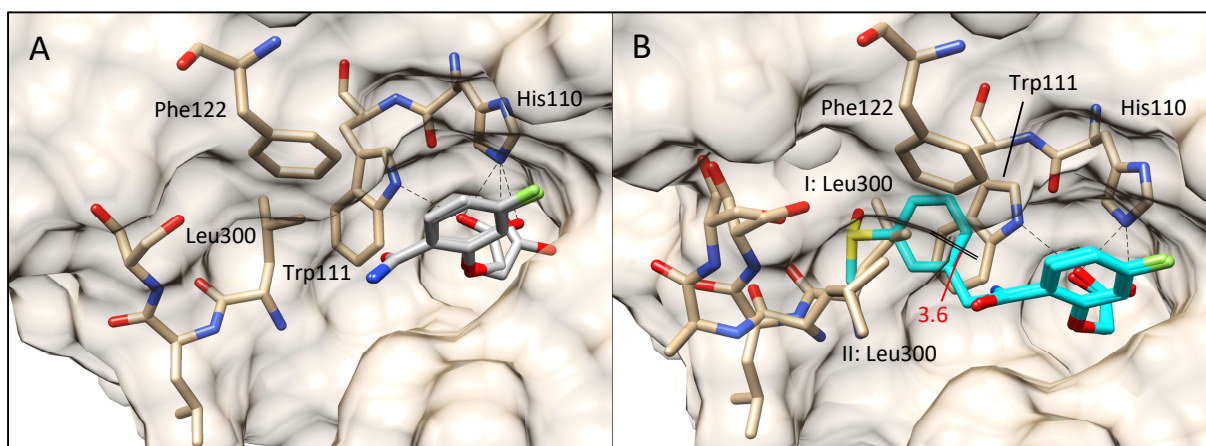


Abb. 13: Kristallstrukturen der synthetisierten Inhibitoren **11** (A, Stäbchenmodell in grau) und **12** (B, Stäbchenmodell in cyan) mit einer Auflösung von 1.15 Å für **11** und 1.06 Å für **12**. Inhibitor **11** hat zwei Konformationen, jedoch ist der Benzylrest mit der Boronsäure fehlgeordnet und nicht in der Struktur zu sehen. Die Spezifitätstasche bleibt hier geschlossen. Inhibitor **12** besitzt ebenfalls zwei Konformationen des Fluorsalicylsäure-Segments und penetriert mit der Sulfoxid-Einheit (Besetzung von 68%) die Spezifitätstasche, welche teilweise im offenen Zustand vorliegt (Besetzung des Leu300: 58% für I und 42% für II). Die Aminosäurereste sind in hellbraun, während die Heteroatome als farbkodierte Atome dargestellt sind. Günstige Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarz gestrichelte Linien sowie das π - π -stacking (Abstand in Å und rot) zwischen Trp111 und Benzylrest von **12**.

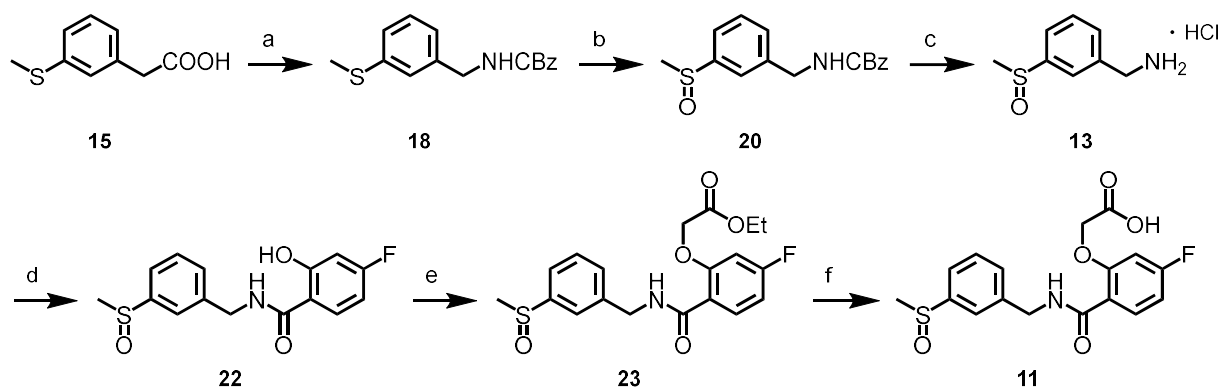
12 Experimental Section

12.1 General Information

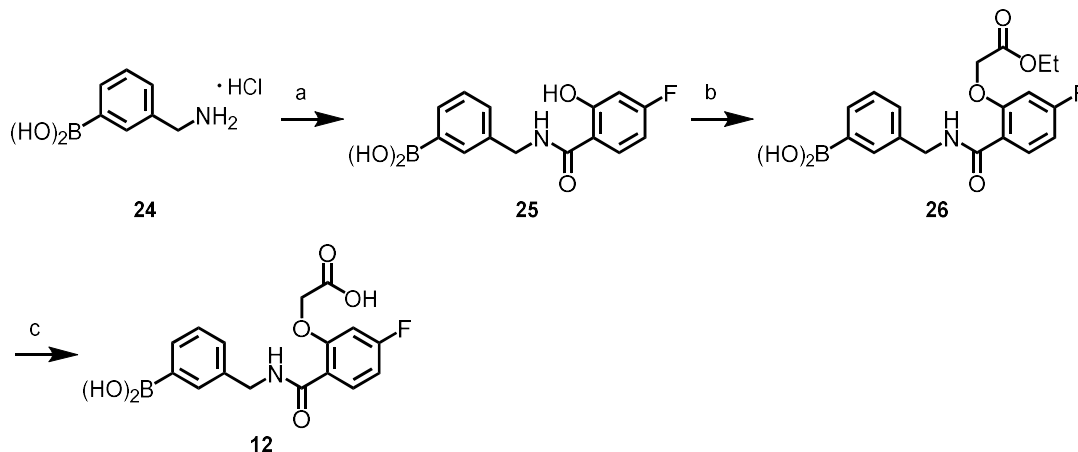
Synthesis. ^1H and ^{13}C NMR spectra were measured on a JEOL ECX-400 or JEOL ECA-500 instrument. Chemical shifts are reported in ppm using residual peaks for the deuterated solvents as internal standard:¹¹⁵ 7.26 ppm (^1H NMR), 77.2 ppm (^{13}C NMR), CDCl_3 ; 2.50 ppm (^1H NMR), 39.5 ppm (^{13}C NMR), $\text{DMSO}-d_6$. The multiplicity of the signals is described with the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublet, m = multiplet, br = broad signal. The coupling constants J are given in Hz. NMR spectra of the inhibitors **11** and **12** represent the signals of the main conformer. MS spectra were measured on a Q-Trap 2000 system with an electrospray interface (ESI). The molecular weight is presented in brackets (see procedures in section 12.2) and was used to calculate the yield of each compound. The exact mass of each compound was calculated by MS (ESI). Flash column chromatography was performed on silica gel (0.04-0.063 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and was monitored by TLC on aluminium sheets (Silicagel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany) with UV light at 254 nm or 366 nm. Preparative HPLC was performed with a Varian HPLC system gradient system (reversed-phase column: Nucleodur C_{18} , 5 μm , 100 Å, 32 x 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany). All solvents were HPLC grade and in a gradient run the percentage of acetonitrile was increased by 0.5% solvent min^{-1} at a flow rate of 20 mL min^{-1} . The purity of all inhibitors used for this study was at least 95% as determined by analytical HPLC with a Shimadzu LC-10A system (reversed-phase column: Nucleodur C_{18} , 5 μm , 100 Å, 4.6 x 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany). All solvents were HPLC grade and in a gradient run the percentage of acetonitrile was increased by 1% solvent min^{-1} at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The detection was recorded at a wavelength of 220 nm. The inhibitors **11** and **12** were lyophilized after purification.

12.2 Procedures of Synthesized Compounds

All performed reactions of this project are summarized in Scheme 11 and 12.

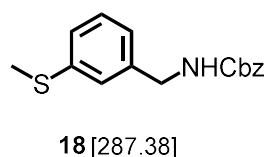


Scheme 11: Overview of all performed reactions for the synthesis of inhibitor **11**. a) DPPA, NEt₃, toluene, rt-90 °C, 2 h then benzyl alcohol (**17**), toluene, 90 °C, 4 h, 61%; b) 35% (w/v) H₂O_{2(aq)}, TAPC, rt, 2 h, 66%; c) 32% (w/v) HCl_(aq), rt, 15 h, 98%; d) 4-Fluorosalicylic acid (**14**), HOBT, EDC · HCl, DIPEA, 0 °C-rt, 18 h, 72%; e) Ethyl bromoacetate, 2 M K₂CO₃, acetone, 50 °C, 3 h, 86%; f) 2 M NaOH, MeOH, rt, 15 h, 42% (yield after purification by preparative HPLC).

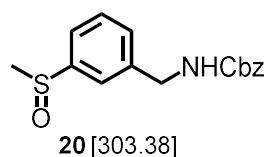


Scheme 12: Overview of all performed reactions for the synthesis of inhibitor **12**. a) 4-Fluorosalicylic acid (**14**), HOBT, EDC · HCl, DIPEA, 0 °C-rt, 18 h; 55%; b) Ethyl bromoacetate, 2 M K₂CO₃, acetone, 50 °C, 3 h, 91%; c) 2 M NaOH, MeOH, rt, 15 h, 22% (over 3 steps and after purification by preparative HPLC).

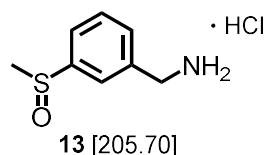
12.2.1 Synthesis of Inhibitor 11



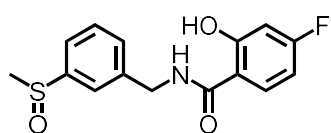
Benzyl (3-(methylthio)benzyl)carbamate (18): To a solution of 2-(3-(methylthio)phenyl)acetic acid (**15**, 1.00 g, 5.48 mmol) in toluene (20 mL) triethylamine (0.88 mL, 6.31 mmol) and DPPA (1.36 mL, 2.30 mmol) were added. The mixture was stirred for 1 h at rt and afterwards for 1 h at 90 °C. Benzyl alcohol (0.63 mL, 6.03 mmol) was added and the mixture was stirred for 4 h at 90 °C. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was directly used for the next reaction. **18** (0.970 g, 3.34 mmol, 61%) was obtained as a yellow oil without further purification. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.43-7.20 (m, 6H), 7.14-7.12 (m, 2H), 7.04-7.02 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.19 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 156.3, 140.5, 138.0, 137.1, 130.0, 128.8, 128.3, 127.6, 124.4, 124.3, 123.5, 65.3, 43.6, 14.6. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₁₆H₁₇NO₂SNa [M+Na]⁺: 310.09; found: 310.15.



Benzyl (3-(methylsulfinyl)benzyl)carbamate (20): A mixture of sulfide **18** (947 mg, 3.27 mmol), TAPC (114 mg, 0.32 mmol) and 35% (w/v) hydrogen peroxide solution (298 μL, 4.45 mmol) was added at rt. After 2 h water (20 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 1:7). **20** (655 mg, 2.16 mmol, 66%) was obtained as light-yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.90 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.56-7.50 (m, 2H), 7.42-7.30 (m, 6H), 5.06 (s, 2H), 4.30 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.72 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 156.4, 146.4, 141.2, 137.1, 129.3, 129.2, 128.3, 127.8, 127.7, 122.1, 121.8, 65.4, 43.6, 43.2. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₁₆H₂₁N₂O₃S [M+NH₄]⁺: 321.12; found: 321.22.



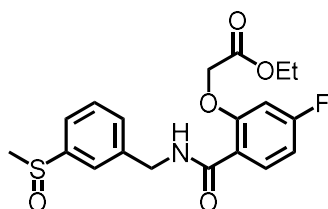
(3-(methylsulfinyl)phenyl)methanamine · HCl (13): Sulfoxide **20** (496 mg, 1.64 mmol) was dissolved in 32% (w/v) hydrogen chloride solution (12 mL). The mixture was stirred for 15 h at rt. The solvent was removed under reduced pressure. **13** (329 mg, 1.60 mmol, quantitative yield) was obtained as white solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.55 (s, 3H), 7.86 (s, 1H), 7.69-7.59 (m, 3H), 4.11 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.76 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 146.6, 135.3, 131.2, 129.3, 124.1, 123.5, 43.1, 41.8. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₉H₁₆NOS [M+MeOH+H]⁺: 202.10; found: 202.07.



22 [307.34]

4-fluoro-2-hydroxy-N-(3-(methylsulfinyl)benzyl)benzamide (22):

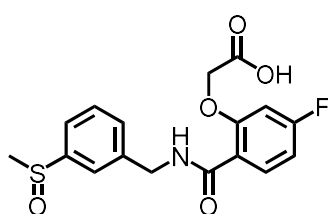
Adapted to the general procedure **GP1** from section 7.2, **22** was prepared using 4-fluorosalicyclic acid (**14**, 100 mg, 0.641 mmol), amine **13** (145 mg, 0.705 mmol), HOBt hydrate (108 mg, 0.705 mmol), EDC hydrochloride (135 mg, 0.705 mmol) and DIPEA (0.28 mL, 1.60 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 5:1). **22** (141 mg, 0.459 mmol, 72%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.89 (s, 1H), 9.38 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.97 (dd, J = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.58-7.48 (m, 3H), 6.80-6.74 (m, 2H), 4.59 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 2.73 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 168.2, 165.0 (d, J = 249.6 Hz), 162.0 (d, J = 13.3 Hz), 146.5, 140.3, 130.2 (d, J = 11.3 Hz), 129.5, 129.2, 122.2, 122.1, 112.1, 106.2 (d, J = 22.3 Hz), 103.9 (d, J = 23.6 Hz), 43.2, 42.1. MS (ESI+) m/z calculated for C₁₅H₁₄FO₃SNa [M+Na]⁺: 330.06; found: 330.16.



23 [393.43]

Ethyl 2-(5-fluoro-2-((3-(methylsulfinyl)benzyl)carbamoyl)phenoxy)acetate (23):

A stirring solution of **22** (120 mg, 0.391 mmol) in acetone (3 mL) was treated with 2 M potassium carbonate solution (0.29 mL, 0.586 mmol) and ethyl bromoacetate (51.9 μL , 0.469 mmol). The mixture was heated to 50 °C. After 3 h the mixture was cooled to rt and the organic solvent was removed under reduced pressure. The mixture was neutralized with 1 M HCl solution, diluted with EtOAc (10 mL) and washed with brine. The organic layer was separated, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (EtOAc). **23** (132 mg, 0.355 mmol, 86%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.95 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.92 (dd, J = 8.7, 7.1 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.58-7.46 (m, 3H), 7.11 (dd, J = 11.1, J = 2.3 Hz, 1H), 6.96-6.91 (m, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.62 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.18 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.72 (d, J = 4.6 Hz, 3H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 168.3, 164.3 (d, J = 248.7 Hz), 163.8, 156.9 (d, J = 11.1 Hz), 146.4, 140.9, 132.9 (d, J = 10.6 Hz), 129.4, 129.2, 122.0, 121.9, 119.1, 108.3 (d, J = 21.5 Hz), 101.6 (d, J = 26.3 Hz), 65.9, 61.1, 43.2, 42.5, 14.0. MS (ESI+) m/z calculated for C₁₉H₂₀FNO₅SNa [M+Na]⁺: 416.09; found: 416.11.



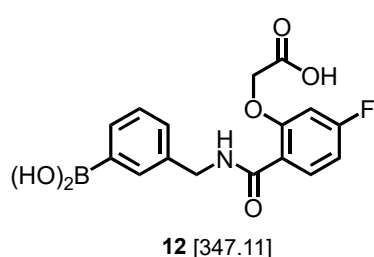
11 [365.38]

2-(5-fluoro-2-((3-(methylsulfinyl)benzyl)carbamoyl)phenoxy)acetic acid (11):

Ester **23** (140 mg, 0.356 mmol) was dissolved in MeOH (3 mL) and 2 M NaOH solution (1.0 mL, 1.96 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 h at rt and afterwards neutralized with 1 M HCl solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL) and washed with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered,

and concentrated in vacuo. The crude product was purified by preparative HPLC. **11** (58 mg, 0.148 mmol, 42%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 9.10 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.93 (dd, J = 8.7, 7.1 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.56-7.48 (m, 3H), 7.09 (dd, J = 11.0, 2.4 Hz, 1H), 6.96-6.90 (m, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.61 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 2.72 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 169.9, 164.3 (d, J = 248.7 Hz), 163.7, 157.1 (d, J = 10.9 Hz), 146.4, 140.8, 132.9 (d, J = 10.7 Hz), 129.4, 129.1, 122.0, 119.0, 108.1 (d, J = 21.5 Hz), 101.6 (d, J = 26.4 Hz), 65.9, 43.2, 42.5. MS (ESI-) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FNO}_5\text{SNa}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 364.06; found: 364.27.

12.2.2 Synthesis of Inhibitor 12

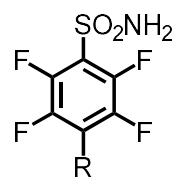
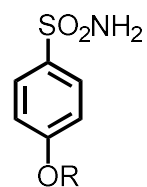
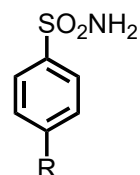
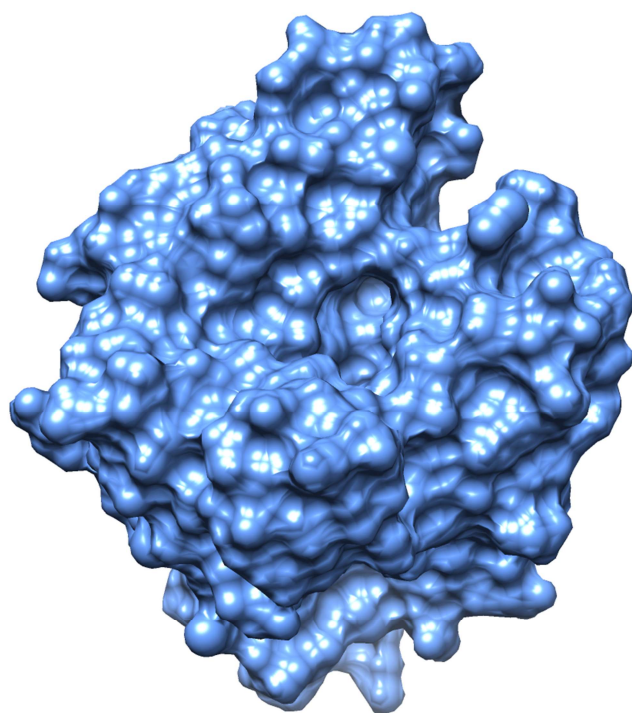


2-(2-((3-boronobenzyl)carbamoyl)-5-fluorophenoxy) acetic acid

(12): Adapted to the general procedure **GP1** from section 7.2, **12** was prepared using 4-fluorosalicyclic acid (**14**, 200 mg, 1.28 mmol), amine **24** (218 mg, 1.16 mmol), HOBt hydrate (197 mg, 1.28 mmol), EDC hydrochloride (245 mg, 1.28 mmol) and DIPEA (0.58 mL, 2.91 mmol). The crude product **25** (184 mg, 0.636 mmol, 55%) was

obtained as a white-yellow solid and directly used for the subsequent ester formation of compound **26**. A stirring solution of **25** (184 mg, 0.636 mmol) in acetone (3.0 mL) was treated with 2 M potassium carbonate solution (0.50 mL, 0.955 mmol) and ethyl bromoacetate (84.5 μL , 0.764 mmol). The mixture was heated to 50 °C. After 3 h the mixture was cooled to rt and the organic solvent was removed under reduced pressure. The mixture was neutralized with 1 M HCl solution, diluted with EtOAc (10 mL) and washed with brine. The organic layer was separated, dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated in vacuo. The crude product **26** was obtained as a white-yellow solid without further purification and directly used for the subsequent saponification to inhibitor **12**. **26** was dissolved in MeOH (3.5 mL) and 2 M NaOH solution (1.6 mL, 3.19 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 h at rt and afterwards neutralized with 1 M HCl solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL) and washed with brine. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated in vacuo. The crude product was purified by preparative HPLC. **12** (90.0 mg, 0.259 mmol, 22% over 3 steps) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 13.3 (s, br, 1H), 9.04 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.96 (dd, J = 8.7, 7.1 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.67-7.65 (m, 1H), 7.39-7.37 (m, 1H), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.09 (dd, J = 11.0, 2.4 Hz, 1H), 6.95-6.91 (m, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.53 (d, J = 6.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 169.9, 164.2, 163.5, 157.1, 138.1, 133.0, 132.9, 132.5, 128.9, 127.3, 119.0, 108.1, 101.6, 65.9, 42.9. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{BFN}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 365.13; found: 365.17.

Teil 3 – Carboanhydrase II



Dieser Teil der Doktorarbeit beinhaltet die Ergebnisse zur Synthese von Inhibitoren der Carboanhydrase II in den Kapiteln 13-17.

Hinweis: Abbildungen, Schemata sowie Molekülstrukturen von chemischen Verbindungen sind in diesem Teil der Arbeit neu nummeriert (jeweils beginnend mit 1).

13 Einleitung

13.1 Funktion und Struktur der humanen Carboanhydrase II (hCAII)

13.1.1 Allgemeine Funktionen und Klassen von CAs

Bei Carboanhydrasen handelt es sich um Metallohydrolasen, welche in physiologischen Prozessen eingebunden sind und dort eine wichtige Rolle spielen. Sie katalysieren u.a. die reversible Reaktion von Kohlendioxid und Wasser zu Hydrogencarbonat unter Abgabe eines Protons (Gleichung 1).



Dies zeigt insofern eine hohe Relevanz, da Kohlenstoffdioxid ein nur wenig wasserlösliches Gas ist und bei hoher Anreicherung in der Zelle oder im Gewebe beispielsweise Membranschäden verursachen kann. Aufgrund der dynamischen Kontrolle der Gleichgewichtsreaktion (Gleichung 1) kann damit das Volumen von Kohlenstoffdioxid sowie durch die Bildung des puffernden Hydrogencarbonats den pH-Wert reguliert werden. Ferner ist es auch in verschiedenen biosynthetischen Reaktionen wie Gluconeogenese, Lipogenese oder im Harnstoffzyklus involviert. Für Bakterien und Pflanzen hat das Enzym eine große Bedeutung in der Photosynthese einschließlich ihrer verbundenen biochemischen Reaktionen.^{142,143} Bis heute sind sieben Carboanhydrasen Gen- bzw. Proteinfamilien bekannt, die sich bezüglich ihrer Quartärstruktur, ihrem Metall (von Zink(II), Eisen(II)¹⁴⁴, Cadmium-(II)¹⁴⁵ oder Kobalt(II)¹⁴⁶) im katalytischen Zentrum und der jeweiligen Koordination des Metallions unterscheiden.¹⁴⁷

Zu den Genfamilien gehören α -CAs, β -CAs und γ -CAs, die vorwiegend in höheren Wirbeltieren, Algen, Prokaryoten und Pflanzen (α - und β -CAs) oder Archaeen (γ -CAs) vorkommen.¹⁴³ Weitere Mitglieder dieser Genfamilie sind die in marinen Kieselalgen vorkommenden δ -CAs und ζ -CAs und die erstmalig 2014 in dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* entdeckten η -CAs.¹⁴⁸ CAs der ϵ -Familie wurden in den marinen Cyanobakterium *Prochlorococcus* sp. und *Synechococcus* sp. sowie im chemolithotrophen Bakterium *Halothiobacillus neapolitanus* gefunden.¹⁴⁹

CAs stellen auf der einen Seite ein interessantes Target in der Wirkstoffentwicklung dar, da sie mit Erkrankungen wie Übergewicht, Ödemen, Osteoporose oder Krebs zusammenhängen.¹⁵⁰ Auf der anderen Seite dient vor allem hCAII auch als gutes Modellprotein, da dieses ähnlich wie die Serinproteasen Thrombin oder Trypsin ausreichend studiert wurden und dementsprechend bei der Entwicklung von diversen Liganden hilfreich sind, um das Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu erweitern.

13.1.2 Struktureller Aufbau von hCAII

Die in Abb. 1 dargestellte Metallohydrolase hCAII besteht aus einer Domäne mit 259 Aminosäuren, die im Zentrum aus zwei 10-strängigen, antiparallelen β -Faltblättern besteht und von mehreren α -Helices umgeben ist. Das aktive Zentrum des Proteins besitzt eine kegelförmige Struktur mit einem Volumen von ca. 900 \AA^3 .¹⁵¹ An der Spitze dieses Kegels befindet sich ein Zn^{2+} -Ion, welches tetraedrisch verzerrt mit drei Imidazol-Gruppen (His94, His96 und His119) sowie einem Wassermolekül oder Hydroxygruppe (je nach pH-Wert) koordiniert wird.

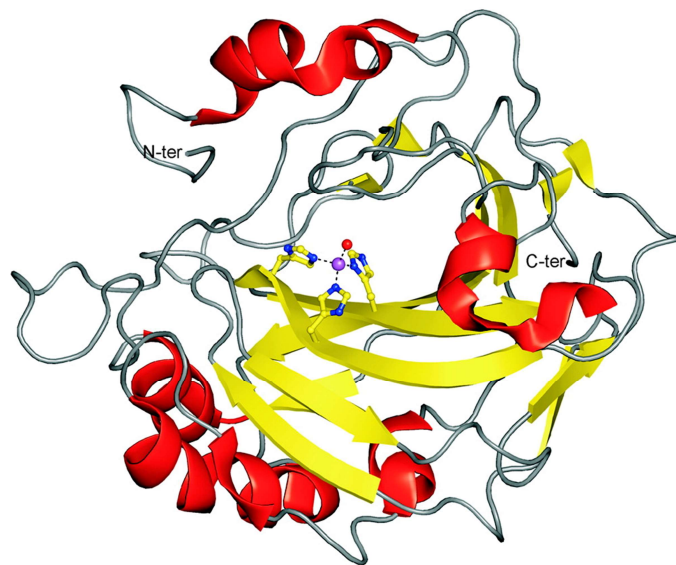


Abb. 1: hCAII-Struktur (PDB 1CA2) mit einem Zn^{2+} -Ion (lila Kugel) im aktiven Zentrum, das mit drei Imidazol-Gruppen (His94, His96 und His119) und einem Wassermolekül/Hydroxidion (rote Kugel) koordiniert ist. Die koordinativen Bindungen sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. α -Helices und β -Faltblättern sind jeweils in rot und gelb, während die Schleifen des Proteins eine graue Farbe besitzen. Weitere Heteroatome sind als farbkodierte Atome gezeigt. Abbildung ist aus *Alterio et al.*¹⁵² entnommen.

Das aktive Zentrum wird in zwei sehr unterschiedliche Umgebungen unterteilt: Die erste wird durch einen Cluster aus hydrophoben Aminosäuren begrenzt, während die andere aus hydrophilen Resten besteht (Abb. 2).¹⁵² Die hydrophobe Oberfläche ist für die Bindung von Substraten und Liganden verantwortlich, welche zusätzlich zwischen einer primären sowie sekundären hydrophoben Fläche unterschieden wird. Die primäre Oberfläche umschließt den Zn^{2+} -Komplex in der hydrophoben Tasche auf einer Seite, die sich weit entfernt von der sekundären hydrophoben Fläche befindet. Hingegen soll die hydrophile Oberfläche die katalytische Aktivität durch die Fixierung eines hochgradig geordneten Netzwerks von Wassermolekülen zwischen dem Zn^{2+} -gebundenen Wassermolekül bzw. Hydroxyd-Ion und der Seitenkette von His64 aufrechterhalten.¹⁵³ Bei der zuletzt genannten Aminosäure handelt es sich um einen *Protonenshuttle*, in der His64 für den Zu- und Abtransport von Protonen sorgt.¹⁵²

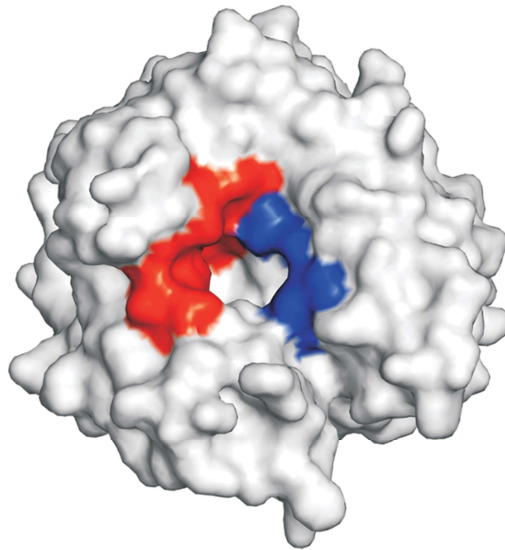
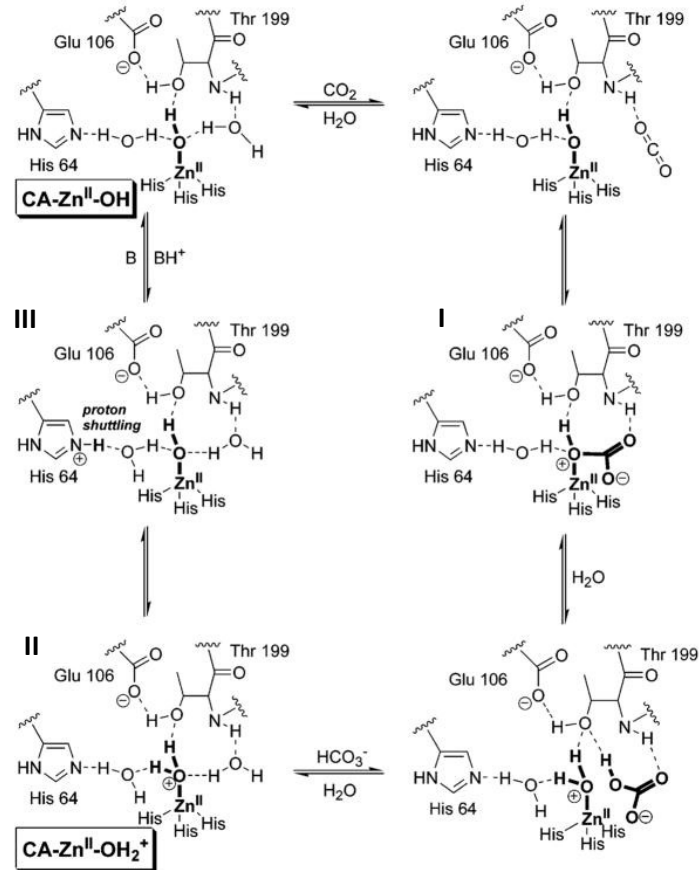


Abb. 2: Lösungsmittelzugängliche Oberfläche von hCAII. Aminosäuren, welche die hydrophobe Hälfte der aktiven Tasche begrenzen, sind rot dargestellt (Ile91, Phe131, Val121, Val135, Leu141, Val143, Leu198, Pro202, Leu204, Val207 und Trp209), während die hydrophile Hälfte in blau gezeigt wird (Asn62, His64, Asn67 und Gln92). Abbildung ist aus *Alterio et al.*¹⁵² entnommen.

13.1.3 Katalysemechanismus

Mit einer katalytischen Effizienz ($k_{\text{cat}}/k_{\text{m}}$) bis zu $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für hCAII sind die katalysierten Reaktionen nahezu diffusionskontrolliert und zählen somit zu den schnellsten aller bekannten Enzymreaktionen.¹⁵⁴ In Schema 31 wird die Katalyse von Kohlenstoffdioxid zu Hydrogencarbonat in der aktiven Tasche von Carboanhydrase unter physiologischen Bedingungen dargestellt, die als „Ping-Pong“-Mechanismus beschrieben wird. Dabei ist das am Zink gebundene Wassermolekül ein Bestandteil eines komplexen Netzwerkes aus Wasserstoffbrückenbindungen, bei welchem die hochgradig konservierten Aminosäuren Thr199 und Glu106 eingebunden sind.¹⁵⁵ Durch diese Wechselwirkungen wird die Nukleophilie und Acidität des Wassermoleküls am Zink stark erhöht, sodass das entstandene Hydroxid-Ion einen nukleophilen Angriff auf Kohlenstoffdioxid unter Bildung der metallkoordinierten Bicarbonatspezies **I** durchführt (Schema 1).^{155,156} Bei **I** handelt es sich um einen instabilen Komplex, der unter Hydrolyse in das katalytisch inaktive Intermediat **II** überführt wird. Im letzten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird nach Deprotonierung der wasserkoordinierten Spezies **II** die katalytisch aktive Komponente **I** regeneriert, welche den katalytischen Zyklus erneut durchlaufen kann. Die Protonenübertragung erfolgt schließlich durch den hierbei entstandenen *Protonenshuttle* **III** über inter- und intramolekulare Prozesse, bei der His64 für den Protonenaustausch verantwortlich ist.^{142,155}

Teil 3 – Carboanhydrase II: Einleitung



Schema 1: Katalysemechanismus von Kohlenstoffdioxid zu Hydrogencarbonat in der CA über Zink(II)-koordinierte Spezies.

Abbildung ist aus *Krishnamurphy et al.*¹⁵⁵ entnommen.

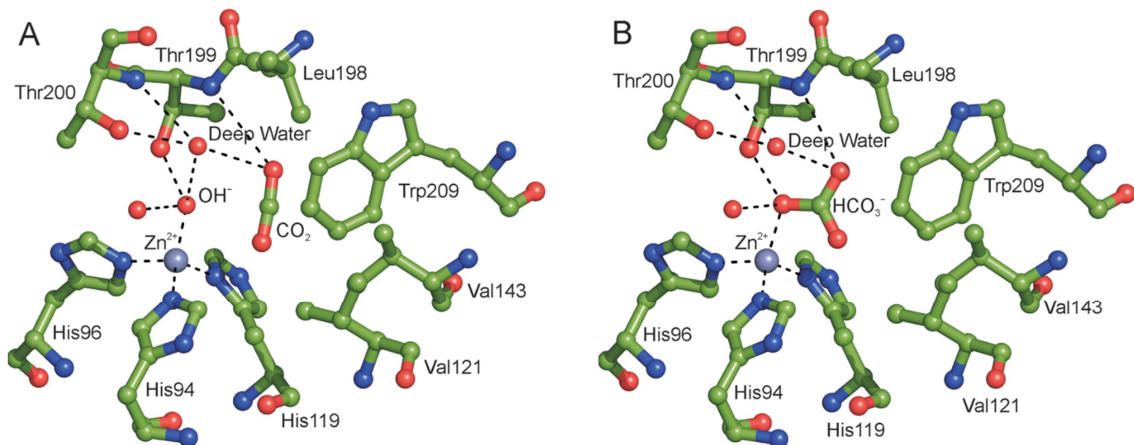


Abb. 3: (A) Kristallstruktur der aktiven Tasche von CA mit der Zink(II)-gebundenen Hydroxid-Ion-Spezies vor dem nukleophilen Angriff auf CO₂ (PDB 2VVA). (B) Kristallstruktur der instabilen Bicarbonatspezies I aus Schema 1 (PDB 2VVB). Die Aminosäuren sind in grün und das Zink(II)-Ion ist als lila Kugel präsentiert. Weitere Heteroatome sind als farbkodierte Atome dargestellt. Abbildung ist aus *Alterio et al.*¹⁵² entnommen.

13.2 Sulfonamid-Liganden in der Wirkstoffentwicklung für CA

Unter den CA-Inhibitoren wird allgemein in zwei Klassen unterschieden: a) den primären Sulfonamiden, die eine tetraedrische Koordination mit Zn^{2+} eingehen und das zuvor gebundene Wasser substituieren; b) den metallkomplexierenden Anionen wie Thiocyanat, die eine Additionsreaktion am Zn^{2+} durchlaufen (Abb. 4).¹⁵⁷

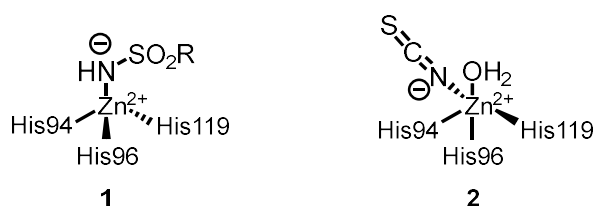


Abb. 4: Komplex **1** stellt die tetraedrische Koordination eines Sulfonamids nach Substitution von Wasser dar und im Vergleich zu Komplex **2** bindet Thiocyanat nach einer Additionsreaktion in einer trigonal-bipyramidalen Geometrie an Zn^{2+} , R = beliebiger Rest.¹⁵⁷

Die inhibitorischen Eigenschaften der Sulfonamide wurden erstmalig 1940 von *Keilin* und *Mann*¹⁵⁸ anhand des Sulfanilamids (**3**) entdeckt, das in den folgenden Jahren als Leitstruktur für die Anti-Glaukom-Medikamente **4-7** sowie der Antikonvulsiva **8** und **9** diente (Abb. 5 und 6).^{143,146}

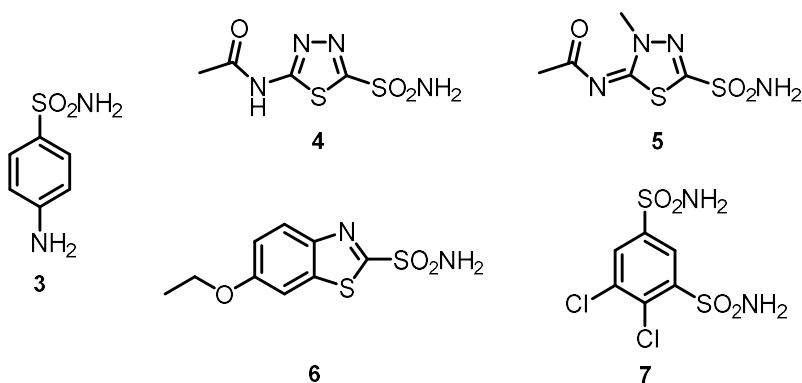


Abb. 5: Sulfanilamid (**3**), das als Leitstruktur verwendet wurde zur Entwicklung weiterer CAIs wie die Anti-Glaukom-Medikament Acetazolamid (**4**), Methazolamid (**5**), Ethoxzolamid (**6**) und Dichlorophenamid (**7**).

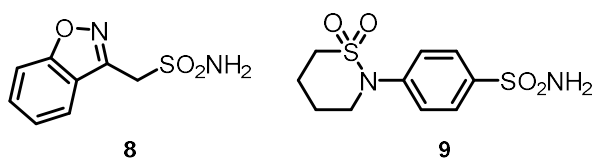


Abb. 6: Die Antikonvulsiva Zonisamid (**8**) und Sulfthiam (**9**).

Der allgemeine Bindungsmodus der Inhibierung wird in Abb. 7 gezeigt, in welcher das Sulfonamid anionisch in einer tetraedrischen Geometrie am Zink(II)-Ion bindet und Wasserstoffbrückenbindungen zu der konservierten Aminosäure Thr199 ausübt. Die Akzeptoreigenschaften der Hydroxyfunktion dieser Seitenkette wird außerdem durch die Wechselwirkungen mit der Carboxygruppe von Glu106 verstärkt.^{150,159}

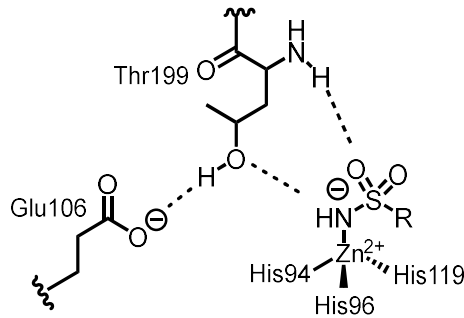


Abb. 7: Darstellung der stabilisierenden Wechselwirkungen eines Sulfonamids im Komplex mit hCAII in der Umgebung von Glu106 und Thr199 des aktiven Zentrums, R = beliebiger Rest.¹⁵⁹

Die Sulfonamidgruppe allein weist nur eine sehr geringe Selektivität auf und es müssen weitere Strukturmotive ergänzt werden, die eine Spezifität gegenüber dem zu inhibierenden Enzym aufweisen. Deshalb ist die Herausforderung bei der Entwicklung potenter CAIs die Sulfonamide so zu funktionalisieren, dass diese spezifisch nur die gewünschte Isoform inhibieren. Beispielsweise führen die Arzneistoffe **4-6** zu Nebenwirkungen u.a. Depressionen, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Magen-Darm-Beschwerden, Nierensteine oder vorübergehende Kurzsichtigkeit.¹⁵⁴ Zur Behebung dieser Probleme wurden in der Wirkstoffentwicklung zwei Strategien zur Erhöhung der Selektivität der einzelnen Isoformen von CA etabliert. Es handelt sich hierbei um den *ring-* und *tail approach* (Abb. 8).

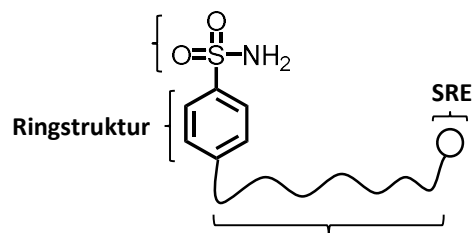


Abb. 8: Strukturmerkmale der CA-Inhibitoren für *ring-* und *tail approach*. SRE = secondary recognition element.

Beim *ring approach* wurden verschiedene Ringsysteme mit variabler Funktionalität systematisch ausgetauscht u.a. haben sich hierbei die bicyclischen Heteroaromaten als Grundkörper etabliert. So entstanden in den 90er-Jahren die in Abb. 9 dargestellten chiralen Anti-Glaukom-Medikamente Dorzolamid (**10**, klinische Zulassung 1995) und Brinzolamid (**11**, klinische Zulassung 1999).^{143,160}

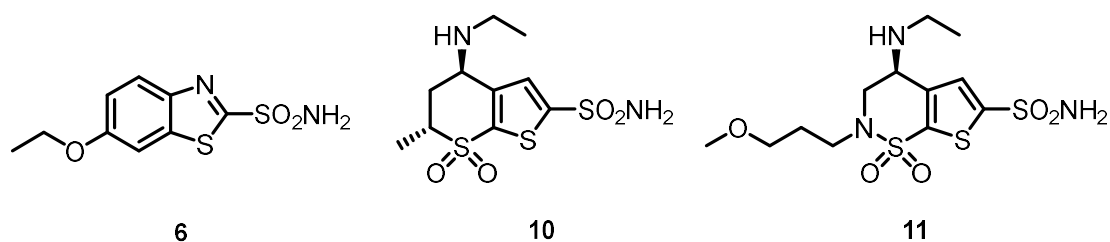


Abb. 9: Die durch den *ring approach* entwickelten Anti-Glaukom-Medikamente Dorzolamid (**10**) und Brinzolamid (**11**) ausgehend von Ethoxzolamid (**6**).¹⁵⁵

Nichtsdestotrotz traten mit den Arzneistoffen **10** und **11** weiterhin Nebenwirkungen auf, welches anhand des *tail approach* durch Supuran *et al.* gelöst werden sollten, bei dem systematisch aliphatische Seitenketten in den aromatischen Sulfonamidkern eingeführt wurden. Der aliphatische Rest kann in der Länge von 1 bis 100 Å variieren, sodass die Reste die *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität des Inhibitors beeinflussen können, indem sie Eigenschaften wie Löslichkeit, Flexibilität, Polarität sowie Bioverfügbarkeit der Verbindung verändern.¹⁴³ Diese Ketten besitzen an ihrem Ende weitere sekundäre Erkennungselemente (*second recognition elements*, SRE), die zusätzliche Wechselwirkungen mit Proteinstellen ausüben, die sich angrenzend zur Bindetasche befinden.^{143,153,155,161}

Beispiele für isozymselektive CAIs sind die von Supuran *et al.* entwickelten kationischen Pyridiniumsalze **12-14** als nano-molare Inhibitoren der CAII und IV, welche die Zellmembran *in vivo* nicht überwinden können. Sie sind in der Lage zwischen den membrangebundenen und den cytosolischen Isozymen zu diskriminieren und binden selektiv an das extrazelluläre Isozym CAIV.¹⁴³

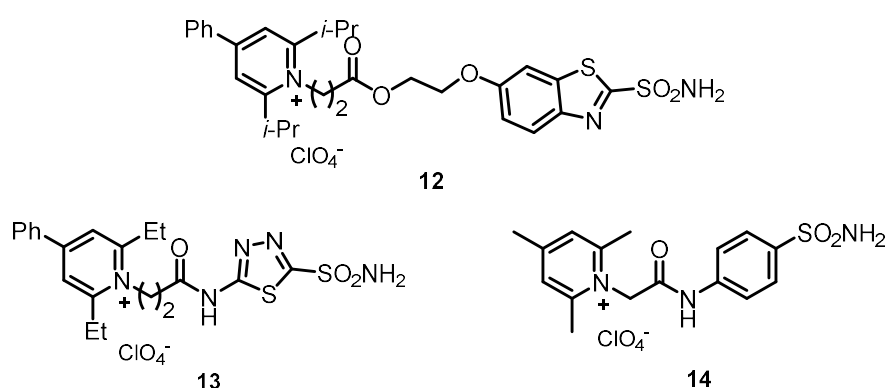


Abb. 10: Pyridiniumsalze **12-14** als selektive Binder der CAIV.

Auch perfluorierte aromatische Systeme wurden entwickelt wie das in Abb. 11 dargestellte 4-Methyl-5-perfluoro-phenylcarboximido- δ^2 -1,3,4-thiadiazolin-2-sulfonamid (PFMZ, **15**), das eine knapp 10-fache höhere Inhibition in hCAII aufweist ($K_i = 1.5$ nM) im Vergleich zur Leitstruktur des Methazolamids (**5**, $K_i = 14$ nM).¹⁶²

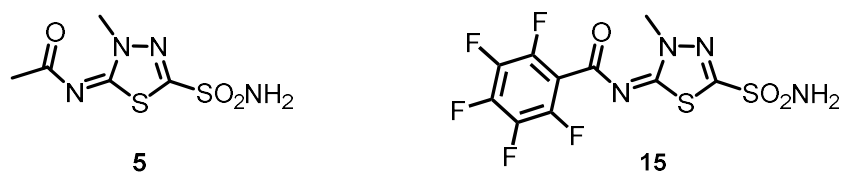


Abb. 11: Das von Methazolamid **5** ausgehende Grundgerüst zur Darstellung von PMFZ (**15**).

Bezüglich der Wechselwirkungen zwischen der Sulfonamid-Zink-Ankergruppe und den Thiadiazolin-Ringkontakten ist der Bindungsmodus von PMFZ (**15**) in der aktiven Tasche des Enzyms ähnlich wie bei den zuvor diskutierten Sulfonamid-Inhibitoren. Ein großer Unterschied lässt sich bei der Untersuchung des Perfluoraromaten von **15** erkennen, dass mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zum Imino-Stickstoff, Carbonyl-Sauerstoff und zum Fluoratom in *o*-position des Liganden **15** durch zwei Wassermoleküle (W1194 und W1199) gebildet werden. Desweiteren konnten Interaktionen zu Gln92 und ein π -stacking des perfluorierten Aromaten mit Phe131 beobachtet werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass potentere CA-Inhibitoren mit Perfluoraryl- und Alkylresten zu verbesserten Antiglaukom-Eigenschaften führen können, die durch die hier neu aufgebauten Wechselwirkungen zum ersten Mal zu sehen sind (Abb. 12).¹⁶²

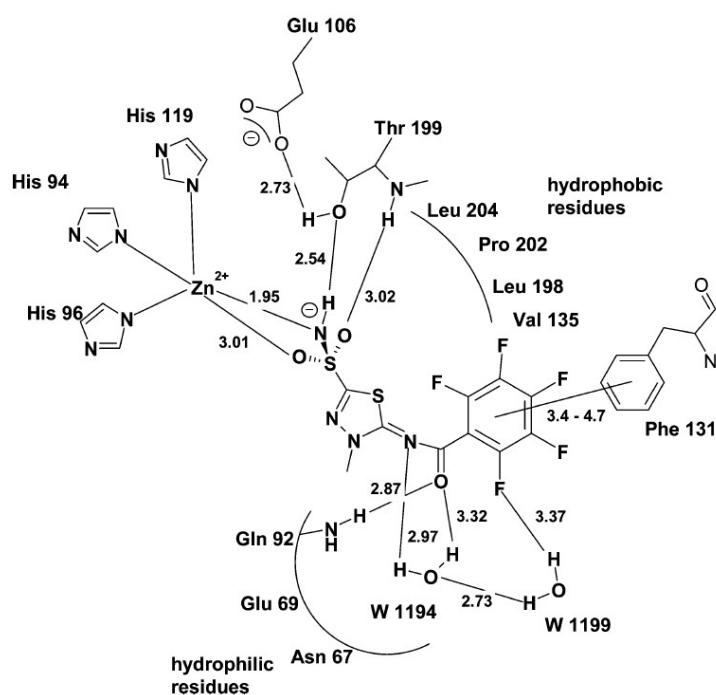
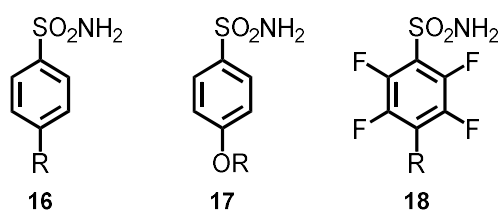


Abb. 12: Bindungspose von PMFZ (**15**) in der aktiven Tasche von hCAII mit den entsprechenden Abständen der Wasserstoffbrückenbindungen in Å dargestellt. Abbildung ist entnommen aus *de Leval et al.*¹⁶³

14 Zielsetzung

Ziel dieses Projektes war die Darstellung einer Serie von *para*-alkylierten Benzensulfonamiden **16** sowie deren Etherderivaten **17** als Carbonanhydrase-Inhibitoren, die in ihrer Alkylkettenlänge schrittweise variiert werden sollten. Die Bindungsprozesse dieser Verbindungen in hCAII sollten kristallographisch, kinetisch sowie thermodynamisch mittels ITC untersucht werden. Da die niedrig-homologen Verbindungen kommerziell erhältlich waren, mussten deren höher alkylierten Derivate **16a-c** und **17a-d** hergestellt werden. Während die Sulfonamidgruppe anionisch am Zink(II)-Ion bindet, adressiert die aliphatische Alkylkette im aktiven Zentrum die hydrophobe Tasche. Das Assoziations- und Dissoziationsverhalten der Inhibitoren **16** und **17** sollten dabei bezüglich ihrer Kinetik sowie ihrer thermodynamischen Bindungsprofile von S. Glöckner (AG Klebe) anhand von ITC-Experimenten untersucht werden.

Weiterhin sollten analog zu den Sulfonamiden **16** und **17** perfluorierte Derivate **18** synthetisiert werden, die ein unterschiedliches Bindungsmuster zum Zn^{2+} aufweisen sollten. Sowohl eine kinetische als auch thermodynamische Studie sollte ebenfalls von **18** durchgeführt werden, die mit den Daten der nicht-fluorierten Serie verglichen werden sollten. Durch die stark elektronenziehenden (-)I-Effekte der Fluorsubstituenten kann die Acidität der freien Sulfonamid-Gruppe erhöht werden, die zu einem möglicherweise veränderten Bindungsverhalten des aromatischen Systems in hCAII führen könnte (Schema 2).

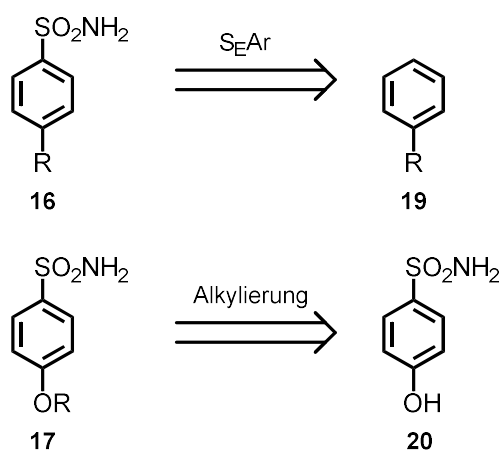


Schema 2: Zielverbindungen **16-18**, die als hCAII-Inhibitoren wirken sollen. R = H (**18a**), Methyl (**18b**), Ethyl (**18c**), Propyl (**17a**, **18d**), Butyl (**17b**, **18e**), Pentyl (**16a**, **17c**), Hexyl (**16b**, **17d**), Heptyl (**16c**).

15 Synthese

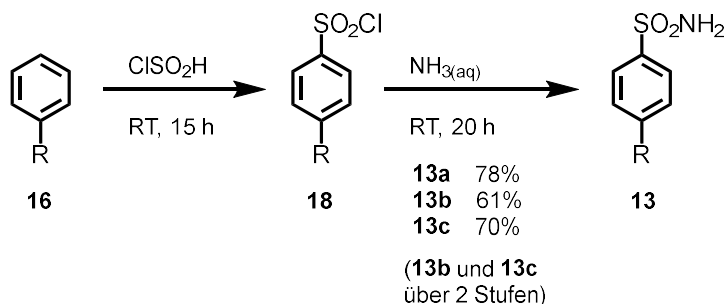
15.1 Darstellung der Inhibitoren 16 und 17

Die Inhibitoren **16** lassen sich über eine elektrophile aromatische Substitution (S_EAr) darstellen. Aufgrund des alkylierten (+)-I-Substituenten von Benzen **19** läuft die Reaktion bevorzugt in *para*-Substitution ab, um somit die Sulfonamid-Gruppe einzuführen. Für die Darstellung der Inhibitoren **17** kann eine Alkylierung der Hydroxyfunktion der Verbindung **20** nach *Carta et al.* durchgeführt werden (Schema 3).¹⁶⁴



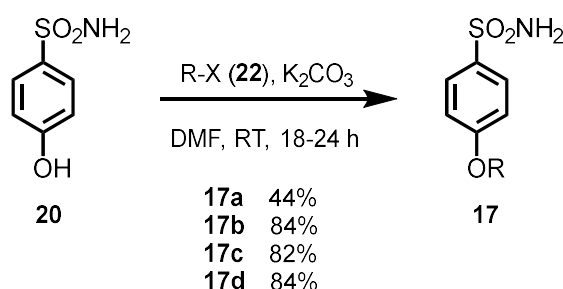
Schema 3: Retrosynthetischer Ansatz der Darstellung der Inhibitoren **16** über S_EAr und für die Synthese der Inhibitoren **17** über eine *O*-Alkylierung.¹⁶⁴

Die verschiedenen Alkylbenzene **19** wurden nach *Ahad et al.*¹⁶⁵ mit Chlorsulfonsäure zu den Sulfonsäurechloriden **21** umgesetzt, welche mit 25% (w/v) wässriger Ammoniaklösung zum Sulfonamid **16** überführt wurde (Schema 4). Ausnahme war die Darstellung von **16a**, das in einer Stufe ausgehend vom kommerziell erhältlichen Sulfonsäurechlorid **21a** (*Fisher Scientific*, s. Schema 12) synthetisiert wurde.



Schema 4: Einführung des Sulfonamids über S_EAr ausgehend vom alkylierten Benzen **19**. R = Pentyl (**16a**, **19a**, **21a**), Hexyl (**16b**, **19b**, **21b**), Heptyl (**16c**, **19c**, **21c**).

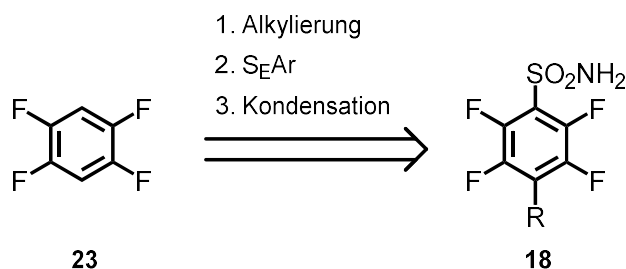
Zur Herstellung der (*O*)-alkylierten Benzensulfonamide **17** wurde ebenfalls nach *Carta et al.* 4-Hydroxybenzensulfonamid (**20**) mit dem entsprechenden Halogenalkan **22** unter basischen Bedingungen versetzt (Schema 5).¹⁶⁴ Die Bildung des alkylierten Nebenprodukts am primären Sulfonamid ließ sich nicht vollständig vermeiden, weshalb die Sulfonamide **17** in moderaten bis guten Ausbeuten erhalten werden konnte. Es bleibt jedoch unerklärlich, weshalb die Darstellung von Verbindung **17a** in einer schlechteren Ausbeute verlief, da bei dieser Reaktion die Länge des aliphatischen Restes keine Rolle spielen sollte, wie die Ergebnisse der höher alkylierten Derivate **17b-d** zeigen. Auch scheint das Halogenalkan **22** keinen Einfluss während dieser Reaktion zu haben. So ist die Ausbeute von Verbindung **17a** als Ausreißer anzunehmen.



Schema 5: (*O*)-Alkylierung von **20** zu **17** über nukleophile Substitution. R = Propyl (**a**), Butyl (**b**), Pentyl (**c**), Hexyl (**d**); X = Br (**a**, **c**, **d**), I (**b**).

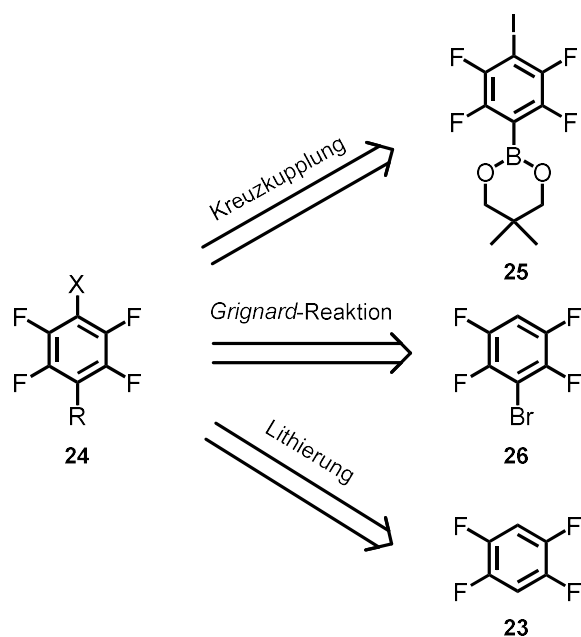
15.2 Darstellung der Inhibitoren **18**

Für die Herstellung der *para*-alkylierten-Tetrafluorbenzensulfonamide **18** muss beachtet werden, dass es sich bei diesen Zielverbindungen um elektronenarme Aromaten handelt und die Syntheseroute der Inhibitoren **16** sich nicht über S_EAr hier analog übertragen lassen. Die Einführung einer Sulfonsäurechloridgruppe muss bei sehr hohen Temperaturen durchgeführt werden, um genügend Aktivierungsenergie bereitzustellen, die eine S_EAr -Reaktion bei elektronenarmen Ringsystemen ermöglicht. Desweiteren muss zuvor die Alkylierung am Aromaten des Tetrafluorbenzen **23** erfolgen, um Nebenreaktionen am Sulfonamid zu vermeiden. Schließlich kann im letzten Schritt das Sulfonamid **18** nach einer Kondensationsreaktion unter Abspaltung von Chlorwasserstoff erhalten werden (Schema 6).



Schema 6: Retrosynthetischer Plan zur Herstellung von Tetrafluorbenzensulfonamide **18**. H (**18a**), Me (**18b**), Et (**18c**), Pr (**18d**), Bu (**18e**).

Es sollten zunächst Methoden zur Alkylierung von Tetrafluorbenzen **23** gefunden werden. Die in Schema 7 aufgeführten Retrosynthesen stellen Beispiele zur Einführung von Alkylgruppen dar und werden jeweils in den Abschnitten 15.2.1-15.2.3 vorgestellt.

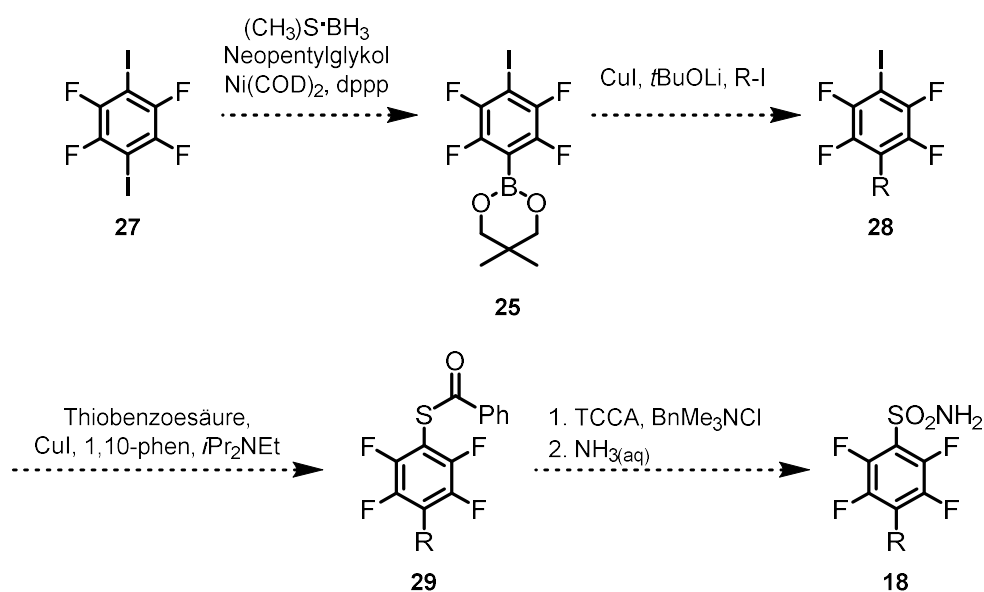


Schema 7: Drei Synthesevorschläge zur Darstellung des alkylierten Tetrafluorbenzens **24**. H (**24a**), Me (**24b**), Et (**24c**), Pr (**24d**), Bu (**24e**); X = H (für Grignard-Reaktion und Lithierung), I (für Kreuzkupplung).

15.2.1 Alkylierung von Tetrafluorbenzen **25** über eine metallkatalysierte Kreuzkupplung

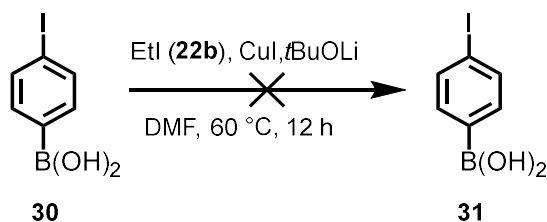
Eine Möglichkeit wäre die Herstellung des Boronsäureesters **25**, mit dem eine *Suzuki*-artige Kreuzkupplung die Alkylgruppen eingeführt werden könnten. Ausgangspunkt dieser Synthese sollte hierbei eine nickelkatalysierte Reaktion der Tetrafluor-diiodbenzen-Verbindung **27** zu **25** nach *Moldoveanu et al.* dienen.¹⁶⁶ In der Regel laufen *Suzuki*-Kupplungen ausgehend von sp²-hybridisierten Boronsäure(ester)-Verbindungen unter Verwendung eines Palladium-Katalysators bevorzugt mit

Reaktanden ab, deren Halogensubstituenten sich an sp^2 bzw. sp^3 -Zentren befinden.^{138,167–171} Allerdings wurden auch erfolgreiche Boronsäure(ester)-Umsetzungen von *Yang et al.*¹⁷² berichtet, in denen kupferkatalysierte Kreuzkupplungen mit sp -hybridisierten Halogenalkanen durchgeführt wurden, sodass ähnlich zu dieser Vorschrift Verbindung **25** hergestellt werden könnte. Eine anschließende Umfunktionalisierung des Aryliodids **28** könnte in einer weiteren kupferkatalysierten Kupplung zum Thiobenzoessäurephenylester **29** erfolgen, welches über eine oxidative Chlorierung und Kondensationsreaktion das gewünschte Sulfonamid **18** nach *Ho et al.*^[61] bilden würde (Schema 8).



Schema 8: Geplante Umsetzung von Verbindung **27** zum Boronsäureester **25**, das über eine kupfervermittelte Kreuzkupplung mit verschiedenen Alkyljodiden zum alkylierten Tetrafluorbenzen **18** führt. R = H, Me, Et, Pr, Bu.

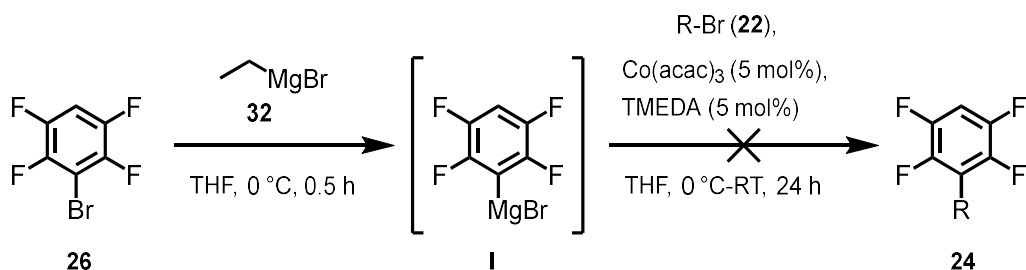
Bevor diese vierstufige Syntheseroute begonnen wurde, sollte zunächst die modifizierte kupfervermittelte *Suzuki*-Kupplung an der kommerziell erhältlichen nicht-fluorierten freien Boronsäure **30** in einer Testreaktion erprobt werden (Schema 9). Hierbei zeigten jedoch weder NMR-Spektroskopie noch massenspektroskopische Analysen Spuren des gewünschten alkylierten Produkts **31**, sodass diese Syntheseroute zur Darstellung von alkylierten Tetrafluorbenzenen **24** verworfen wurde.



Schema 9: Fehlgeschlagene Testreaktion der Boronsäure **30** mit Ethyliodid (**22b**) zu **31** für die geplante Kreuzkupplung in Schema 8 (**25** zu **28**).

15.2.2 Alkylierung von Tetrafluorbenzen **26** über eine *Grignard*-Reaktion

Eine weitere Alkylierungsmöglichkeit zur Herstellung von Tetrafluorbenzen **24** sollte über eine *Grignard*-Reaktion ablaufen. Das hierbei *in situ* gebildete *Grignard*-Derivat **I** sollte anschließend kobaltkatalysiert mit den entsprechenden Alkylbromiden **22** umgesetzt werden analog zu *Cahiez et al.* (Schema 10).¹⁷³ Allerdings konnte bei der Reaktion von **26** mit Ethylgrignard **32** und Methyl (**22a**) bzw. Propylbromid (**22c**) durch DC-Kontrolle sowie nach verlängerter Reaktionszeit von 24 h keinen Umsatz des Edukts **26** festgestellt werden. Da die Lithiierung von Tetrafluorbenzen **22** bereits erste erfolgreiche Ergebnisse erbrachte (Abschnitt 15.2.3) wurde diese hier beschriebene Synthesemethode aufgrund der schlechten Resultate nicht weiterverfolgt.

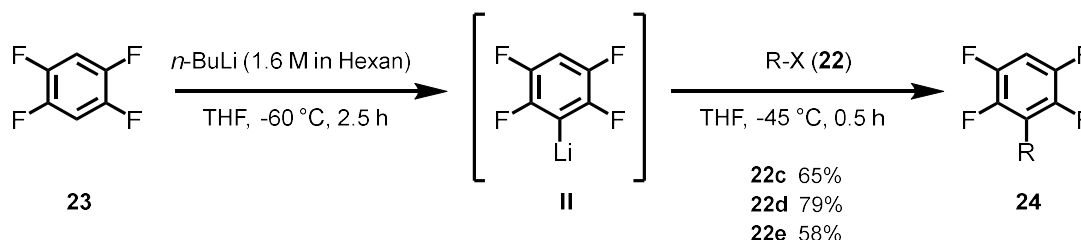


Schema 10: Fehlgeschlagene Alkylierung von **24a** (R = Me) und **24c** (R = Pr) über eine *Grignard*-Reaktion.

15.2.3 Alkylierung von Tetrafluorbenzen **23** über Lithiierung

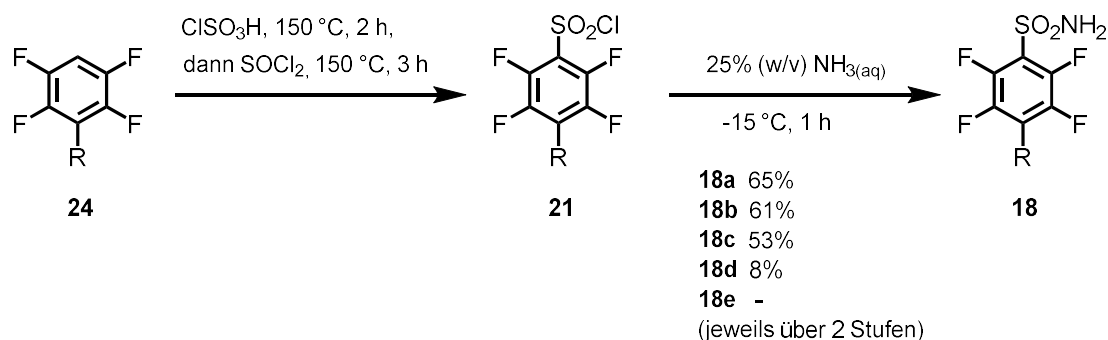
Wie in 15.2.2 muss bei dieser Syntheseroute das Edukt **23** in ein Nukleophil überführt werden, um eine nukleophile Substitution mit den verschiedenen Halogenalkanen **22** entsprechend durchführen zu können. So wurde die hohe Acidität des Aromaten aufgrund der starken (-)I-Effekte der Fluorsubstituenten genutzt, um eine Lithiierung zu erzielen. Nach einem Li-H-Austausch an Verbindung **23** wird das Intermediat **II** gebildet, das ein gutes Nukleophil darstellt, um dieses mit den Halogenalkanen **22** umsetzen zu können unter Erhalt der gewünschten alkylierten Produkte **24**. Bei der Verwendung dieser Methode konnten erfolgreich die alkylierten Tetrafluorbenzene **24c-e** in

moderaten bis guten Ausbeuten erzielt werden (Schema 11). Es ist anzumerken, dass die Produkte **24** flüchtige Substanzen sind, sodass eine Destillation zur Aufreinigung von **24** benötigt wurde. Sowohl die Entfernung des organischen Lösungsmittels als auch die Isolierung von **24** waren am Rotationsverdampfer nicht zu kontrollieren ohne diese unter verminderten Druck zu verflüchtigen.



Schema 11: Synthese der alkylierten Tetrafluorbenzene **22c-e** durch Lithiierung von **23** unter abschließender nukleophilen Substitution mit den entsprechenden Halogenalkanen **22**; R = Et (**22b**, **24c**), Pr (**22c**, **24d**), Bu (**22d**, **24e**); X = Br (**22c**, **22d**), I (**22b**).

Da das Methylderivat **24b** kommerziell erworben wurde und für die Darstellung von Sulfonamid **18a** keine Alkylierung des Tetrafluorbenzens **24a** von Nöten war, so konnten die Verbindungen **23a** sowie **23b** direkt zu ihren jeweiligen Sulfonamiden **18a** und **18b** überführt werden. Erwähnenswert ist auch, dass die S_EAr -Reaktion durch Chlorsulfonierung nicht analog zur Darstellung der unfluorierten Sulfonamide **16** ablaufen kann, da hier ein Elektronenmangel des aromatischen Systems vorliegt, bei der zusätzliche Energie für die Einführung der Sulfonsäurechloridgruppe benötigt wird. Temperaturen bis zu 150 °C wurden eingesetzt zur *in situ*-Bildung der Sulfonsäuren, die mit Thionylchlorid zu den Sulfonsäurechloriden **21** ähnlich zu *de Leval et al.*¹⁶³ und der abschließenden Kondensation nach *Dudutiené et al.*¹⁷⁴ mit wässriger Ammoniaklösung die Inhibitoren **18** erhalten werden konnten. So wurden in jeweils zwei Stufen die Inhibitoren **18a-c** in guten Ausbeuten hergestellt, während Verbindung **18d** eine schlechte Ausbeute von 8% über zwei Stufen lieferte. Unerwarteterweise konnten diese Reaktionsbedingungen nicht auf das Butylderivat **18e** angewandt werden, da beim Umsatz vom alkylierten Tetrafluorbenzen **24e** keine erfolgreiche Chlorsulfonierung zu Verbindung **21e** durchgeführt werden konnte (Schema 12).



Schema 12: Darstellung der Inhibitoren **15** ausgehend vom alkylierten Tetrafluorbenzen **24**; R = H (**18a**, **21a**), Me (**18b**, **21b**), Et (**18c**, **21c**), Pr (**18d**, **21d**), Bu (**18e**, **21e**).

Die schlechte Ausbeute zur Darstellung des Propylderivats **18d** war dahingehend unerwartet, da die elektrophile aromatische Substitution mit längeren Alkylketten aufgrund des steigenden (+)-I-Effektes begünstigt werden sollte. Auch sterische Gründe können dieses Resultat nicht erklären, da sich die jeweilige Alkylkette in *p*-Position befindet und somit keinen großen Einfluss auf die $S_E\text{Ar}$ -Reaktion haben sollte. Dies lässt sich ebenso auf die Chlorsulfonierung des Butylderivats **21e** übertragen, bei welcher die Einführung der Sulfonsäurechloridgruppe nicht stattgefunden hatte. Da die Synthese des Sulfonsäurechlorids **21e** erfolglos blieb, konnte das entsprechende Sulfonamid **18e** nicht hergestellt werden. Die Ausbeuten der niedrigeren Homologen **18a-d** wurden nicht weiter optimiert, da anhand der DC-Kontrollen das jeweilige Sulfonsäurechlorid **21a-d** bei der Reaktion in wässriger Ammoniaklösung stets vollständig umgesetzt wurde. Es wurde allerdings jederzeit beachtet, dass bei diesen Reaktionen *Schotten-Baumann*-Bedingungen vorlagen, indem ein Überschuss der Base verwendet wurde, um die Freisetzung von Salzsäure zu neutralisieren und damit die Protonierung von Ammoniak zu Ammoniumchlorid zu unterbinden. Ein Ammonium-Ion kann nicht als Nukleophil fungieren.^{138,174} In diesem Fall wurde bereits ein basisches Reagenz verwendet, sodass keine weiteren Additive zur Neutralisation bei der Reaktion gebildeten Salzsäure hinzugefügt werden musste.

Wird jedoch eine von S. Glöckner erstellte Kristallstruktur des Inhibitors **18d** im Komplex mit hCAII in Betracht gezogen, so lässt sich in der aktiven Tasche feststellen, dass das Propylderivat **18d** mit seiner endständigen Methylgruppe des aliphatischen Restes leicht umklappt und nicht wie erwartet vollständig in der hydrophoben Tasche bindet (Abb. 13). Stattdessen bevorzugt diese Methylgruppe eine Orientierung, die unpolare Wechselwirkungen mit dem *o*-befindlichen Fluorsubstituenten erlaubt und es erscheint, dass diese Geometrie eher durch intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb des Liganden als durch Wechselwirkungen mit dem Protein erzwungen wird. Diese überraschende Interaktion fällt deutlich auf und könnte eine Erklärung sein, weshalb auch die Synthese mit schlechteren Ausbeuten verlief, obwohl solche Reaktionsbedingungen nicht direkt aus Protein-Ligand-Wirkungsbeziehungen zu übertragen sind. Nichtsdestotrotz könnte dieser intramolekulare Fluor-

Kohlenstoff-Kontakt die S_EAr -Reaktion stören, da durch diese Umorientierung eine sterisch gehinderte Geometrie über dem aromatischen System entsteht. Fraglich bleibt, ob dieser Effekt auch einen elektronischen Einfluss auf die Chlorsulfonierung hat. Jedenfalls würde diese Beobachtung bestätigen, dass mit steigender Alkylkettenlänge die Einführung der Sulfonsäurechloridgruppe erschwert wird und dementsprechend begründen, weshalb ab der Länge einer Butylkette keine erfolgreiche Umsetzung aus sterischen Gründen mehr möglich war. Zwar konnten die ITC-Ergebnisse der Inhibitoren **18** anhand thermodynamischer Daten von *S. Glöckner* erfolgreich beschrieben werden ($K_d = 3\text{-}34\text{ nM}$), jedoch waren diese Verbindungen kinetisch in der ITC nicht bestimmbar. Die fluorierten Inhibitoren **18b-d** weisen eine zu starke Affinität in hCAII auf, sodass sie mittels Verdrängungstitrationen untersucht werden mussten. Mit Hilfe eines solchen Messprotokolls lassen sich die Verbindungen zwar thermodynamisch charakterisieren, aber die kinetischen Daten werden nicht zugänglich, da sich zu viele Faktoren überlagern, um gesichert die Signalverbreiterung der einzelnen Einspritzungen im Thermogramm auszuweiten. Aus diesem Grund wurde die Synthese der Inhibitoren **18** nicht optimiert bzw. weiterverfolgt.

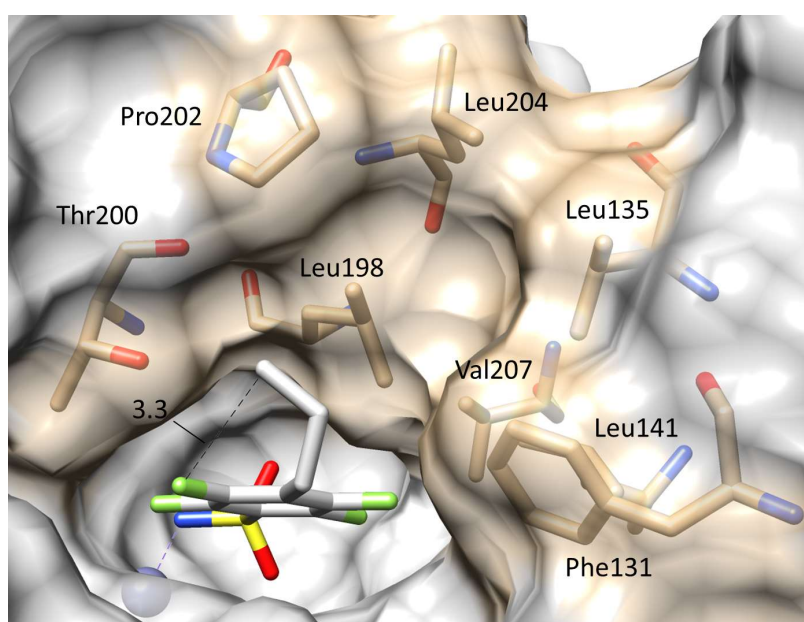
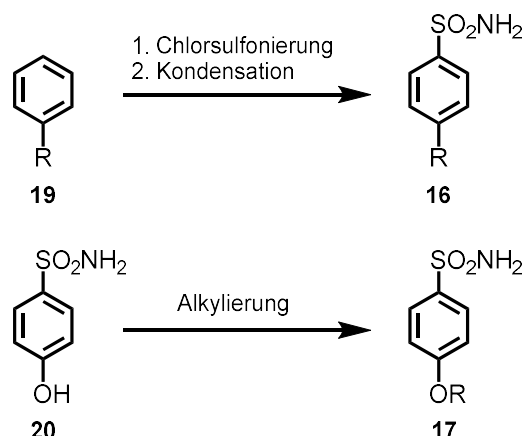


Abb. 13: Ligand **18d** als graues Stäbchenmodell in der aktiven Tasche von hCAII mit Koordination der Aminogruppe des Sulfonamids zum Zn^{2+} (violette Kugel und violette gestrichelte Linie). Die intramolekulare Wechselwirkung der Propylgruppe mit dem *o*-ständigen Fluorsubstituenten ist als schwarz gestrichelte Linie gezeichnet. Die hydrophobe Umgebung ist in hellbraun und die Heteroatome sind als farbkodierte Atome dargestellt.

16 Zusammenfassung

Im vorliegenden Projekt konnten die Inhibitoren **16a-c** und **17a-d** hergestellt werden, indem auch ihre aliphatischen Reste entsprechend variiert wurden. Während die Inhibitoren **16** über eine S_EAr -Reaktion aus den aliphatischen Benzenderivaten **19** erhalten wurden, so gelang es die Etherderivate **17** über *O*-Alkylierungen ausgehend von den Sulfonamiden **20** zu synthetisieren (Schema 13).



Schema 13: Darstellung der Inhibitoren **16** und **17**. 61-78% (über eine Stufe zu **16a** und über 2 Stufen zu **16b** und **16c**), 44-84% (für **17**), R = Propyl (**17a**), Butyl (**17b**), Pentyl (**16a**, **17c**), Hexyl (**16b**, **17d**, **19b**), Heptyl (**16c**, **19c**).

Die Verbindungen beider Serien wurden, neben kommerziell erworbenen Verbindungen, von *S. Glöckner* kristallisiert und durch ITC-Messungen analysiert. Es stellt sich heraus, dass diese gut in der aktiven Tasche am Zink(II)-Ion koordinieren und die hydrophobe Tasche mit ihrer Alkylkette adressieren (Abb. 14).

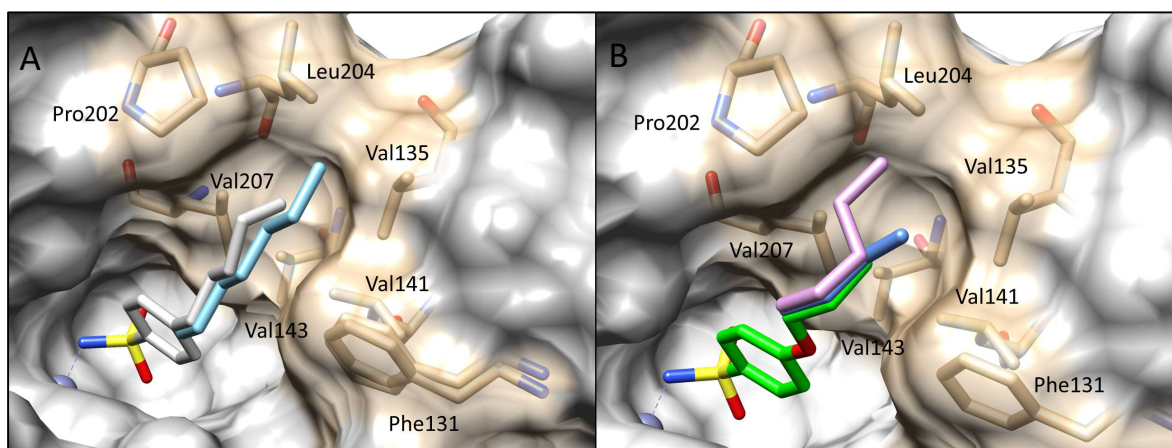
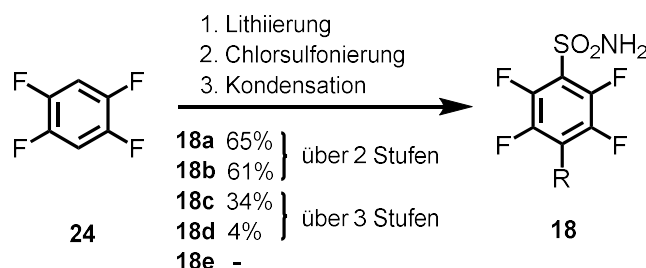


Abb. 14: Bindungsmodi der Liganden **16** und **17** als Stäbchenmodell in der aktiven Tasche von hCAII mit Koordination der Aminogruppe des Sulfonamids zum Zn^{2+} (violette Kugel und violett gestrichelte Linie) sowie die verschiedenen Alkylketten in der hellbraunen hydrophoben Umgebung überlagert. (A) **16a** (grau) und **16b** (hellblau). (B) Etherderivate **17** (a grün, b blau, c rosa). Heteroatome sind als farbkodierte Atome dargestellt.

ITC-Experimente haben sowohl thermodynamische als auch kinetische Daten geliefert, sodass das Bindungsverhalten der Inhibitoren **16** und **17** miteinander verglichen werden konnte. Es kann bestätigt werden, dass es sich bei **16a**, **17a** sowie **17b** um mikromolare Binder handelt ($K_d = 1\text{--}3\text{ }\mu\text{M}$). Für die Inhibitoren **16b** und **17c** konnten keine zuverlässigen kinetischen Resultate in der ITC erhalten werden, da sie zu potent waren, um sie über diese Methode kinetisch bestimmen zu können. Ferner konnten für die langkettigen Derivate **16c** sowie **17d** keine aussagekräftigen Kristallstrukturen erhalten werden, da die aliphatischen Reste jeweils nicht vollständig in ihren Elektronendichten zu beobachten waren. Demzufolge gibt es auch keine ITC-Daten. Weitere Ergebnisse sind aus der Doktorarbeit von *Glöckner*¹⁷⁵ zu entnehmen.

Im Zuge dieses Projektes wurden außerdem Alkylierungen der Tetrafluorbenzene **24** durch Lithierungen erfolgreich durchgeführt, die über S_EAr -Reaktionen mit anschließender Kondensation zu den Inhibitoren **18a-d** führten (Schema 14).



Schema 14: Synthese der Inhibitoren **18**. **18a** und **18b** wurden aus den kommerziell erworbenen Sulfonsäurechloriden **24a** und **24b** erhalten. R = H (**18a**), Me (**18b**), Et (**18c**), Pr (**18d**), Bu (**18e**).

Insgesamt konnten über diese Syntheseroute die Inhibitoren **18a-d** erhalten werden, welche gute (für **18a-c**) bis schlechte Ausbeuten (für **18d**) lieferten. Bedauerlicherweise konnten unter diesen Reaktionsbedingungen die gewünschte Zielverbindung **18e** nicht hergestellt werden. Problematisch war dabei die Darstellung des Sulfonsäurechlorids **21e**, das möglicherweise auf sterische Gründe aufgrund der möglichen intramolekularen Wechselwirkung zwischen dem *o*-positionierten Fluorsubstituenten und der endständigen Propylkette zurückzuführen ist. Möglicherweise resultiert daraus auch die schlechte Ausbeute des Propylderivats **18d**, welches eventuell analog zu dem gebundenen Zustand in hCAII eine rückgefaltete Konformation annimmt (Abb. 14, Abschnitt 15.2.3; Abb. 15, grauer Ligand). Aufgrund der hohen Affinität der Inhibitoren **18b-d** gegenüber hCAII konnten keine kinetischen Messungen mittels ITC durchgeführt werden, sodass keine Optimierung der Darstellung von fluorierten Verbindungen im Fokus stand.

Hingegen konnten die synthetisierten Verbindungen **18a-d** thermodynamisch mit ITC untersucht werden ($K_d = 3\text{--}34\text{ nM}$) und zusätzlich ließ sich durch die in Abb. 15 gezeigten Kristallstrukturen ihr Bindungsmodus im Protein charakterisieren. Die Fluorderivate **18** nehmen überraschende

Bindungsposen ein, bei der einerseits polare Wechselwirkungen durch ein Fluorsubstituenten mit der Hydroxygruppe des Thr200 zu beobachten sind, andererseits existieren aber auch unpolare Interaktionen durch die Fluoratome, vor allem in *m*-Stellung zur Sulfonamidgruppe, in einer kleinen hydrophoben Tasche. Zwar zeigen die aliphatischen Reste für **18b** und **18c** in Richtung der hydrophoben Umgebung, dennoch orientiert sich das Propylderivat **18d** mit seiner endständigen Methylgruppe wie oben beschrieben unter Bildung einer intramolekularen Wechselwirkung zum benachbarten Fluorsubstituenten anstatt die hydrophobe Oberfläche stärker mit der Propylkette zu besetzen. Erwähnenswert ist auch die zweite Konformation des Inhibitors **18b**, welche um fast 60 °C gedreht im Vergleich zu den anderen Orientierungen als Hauptkonformation mit einer Besetzung von 65% vorliegt. Beide Konformationen sind in der Lage Kontakt durch ihre Fluorsubstituenten zur Hydroxyfunktion von Thr200 aufzunehmen. Weitere Resultate zur Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung dieser Fluorderivate in hCAII sind in der Doktorarbeit von Glöckner¹⁷⁵ beschrieben.

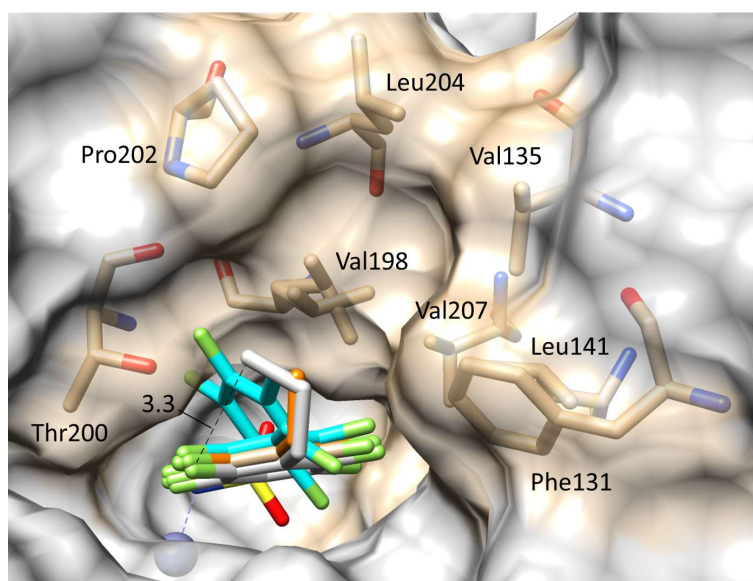


Abb. 15: Überlagerte Komplexstrukturen der Liganden **18** als Stäbchenmodell in der aktiven Tasche von hCAII mit Koordination der Aminogruppe des Sulfonamids zum Zn^{2+} (violette Kugel und violett gestrichelte Linie). **18a** (hellbraun), **18b** (cyan), **18c** (orange), **18d** (grau). Methylderivat **18b** bindet in zwei Konformationen, bei welchen eine um fast 60 °C gedrehte Orientierung vorliegt (Besetzung von 65%). Die hydrophobe Umgebung ist in hellbraun und die Heteroatome sind als farbkodierte Atome präsentiert. Die intramolekulare Wechselwirkung im Komplex mit Ligand **18d** ist als schwarz gestrichelte Linie mit entsprechendem Abstand in Å dargestellt.

17 Experimental Section

17.1 General Information

Synthesis. ^1H and ^{13}C NMR spectra were measured on a JEOL ECX-400 or JEOL ECA-500 instrument. Chemical shifts are reported in ppm using residual peaks for the deuterated solvents as internal standard:¹¹⁵ 7.26 ppm (^1H NMR), 77.2 ppm (^{13}C NMR), CDCl_3 ; 2.50 ppm (^1H NMR), 39.5 ppm (^{13}C NMR), $\text{DMSO}-d_6$. The multiplicity of the signals is described with the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublet, m = multiplet, br = broad signal. The coupling constants J are given in Hz. NMR spectra of the inhibitors **16**, **17** and **18** represent the signals of the main conformer. MS spectra were measured on a Q-Trap 2000 system with an electrospray interface (ESI). The molecular weight is presented in brackets (see procedures in section 17.3) and was used to calculate the yield of each compound. The exact mass of each compound was calculated by MS (ESI). Flash column chromatography was performed on silica gel (0.04-0.063 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and was monitored by TLC on aluminium sheets (Silicagel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany) with UV light at 254 nm or 366 nm. The purity of all inhibitors used for this study was at least 95% as determined by analytical HPLC with a Shimadzu LC-10A system (reversed-phase column: Nucleodur C₁₈, 5 μm , 100 Å, 4.6 x 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Germany). All solvents were HPLC grade and in a gradient run the percentage of acetonitrile was increased by 1% solvent min^{-1} at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The detection was recorded at a wavelength of 220 nm. Chlorosulfonation of the inhibitors **16** were synthesized according to a procedure by *Ahad et al.*¹⁶⁵, whereas (O)-alkylation of **17** were performed similarly to *Carta et al.*¹⁶⁴. Chlorosulfonation and condensation reactions of the fluorinated compounds **18** were afforded adapted to protocols by *de Leval et al.*¹⁶³ and *Dudutienė et al.*¹⁷⁴

17.2 General Procedures of Synthesized Compounds

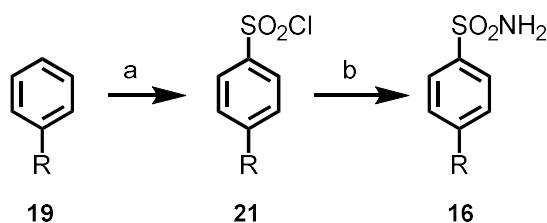
GP1. According to *Carta et al.*¹⁶⁴ 4-Hydroxybenzenesulfonamide **20** (1.0 eq) and potassium carbonate (1.5 eq) were dissolved in dried DMF (10 mL). The suspension was stirred at rt for 20 min under nitrogen atmosphere. The corresponding alkyl halide (1.5 eq) was added and the mixture was stirred for 24 h at rt. The reaction was quenched with water (10 mL) and the resulting precipitate was collected by filtration. The crude product was purified by flash column chromatography.

GP2. Chlorosulfonic acid (5.5 eq) was added to tetrafluorobenzene (**24**, 1 eq) and the mixture was heated at 150 °C. After 2 h, the solution was cooled to rt and thionyl chloride (2.2 eq) was added. The mixture was reheated for additional 3 h at 150 °C and was afterwards cooled to rt. The resulting brown solution was poured dropwise into ice water (20 mL). The obtained suspension was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layer was washed with brine (20 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The crude product **21** was directly used for the subsequent sulfonamide formation according to **GP3**.

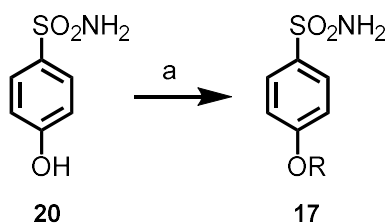
GP3. Sulfonyl chloride (**21**, 1 eq) was dissolved in THF and the mixture was cooled to -15 °C. A solution of 25% (w/v) aqueous NH₃-solution was added until the solution was adjusted to pH = 7. The mixture was stirred for 1 h at rt and water (150 mL) was added. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 100 mL), the combined organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography.

17.3 Detailed Procedures of Synthesized Compounds

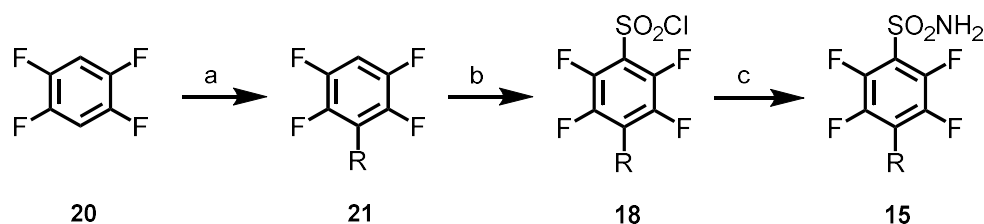
All performed reactions of this project are summarized in Scheme 15-17.



Scheme 15: Overview of all performed reactions for the synthesis of inhibitor **16**. a) ClSO₂H, rt, 15 h; b) 25% (w/v) NH_{3(aq)}, rt, 20 h, 78% (from **21a** for **16a**), 61-70% (from **19b-c** over 2 steps to **16b** and **16c**). R = Pentyl (**16a**, **19a**, **21a**), Hexyl (**16b**, **19b**, **21b**), Heptyl (**16c**, **19c**, **21c**).

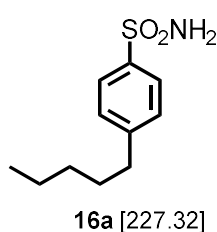


Scheme 16: Overview of all performed reactions for the synthesis of inhibitor **17**. a) R-X (**22**), K₂CO₃, DMF, rt, 18-24 h, 44-84%. R = Propyl (**17a**), Butyl (**17b**), Pentyl (**17c**), Hexyl (**17d**); X = Br (**22a**, **22c**, **22d**), I (**22b**).



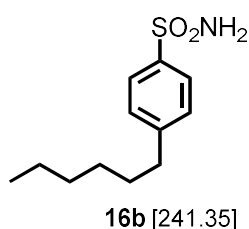
Scheme 17: Overview of all performed reactions for the synthesis of inhibitor **18**. a) *n*-Buli (1.6 M in hexane), THF, -60 °C, 2.5 h then R-X (**22**), THF, -45 °C, 0.5 h, 58-79%. b) ClSO₃H, 150 °C, 2 h then SOCl₂, 150 °C, 3 h; c) 25% (w/v) NH₃(aq), -15 °C, 1 h, 5-65% (over 2 steps). R = H (**18a**, **21a**), Me (**18b**, **21b**), Et (**18c**, **21c**, **22b**, **24c**), Pr (**18d**, **21d**, **22c**, **24d**), Bu (**22d**, **24e**); X = Br (**22c**, **22d**), I (**22b**).

17.3.1 Synthesis of Inhibitor 16a



4-Pentylbenzenesulfonamide (16a): 4-Pentylbenzenesulfonyl chloride (**21a**, 1.50 g, 6.08 mmol, commercially available from *Fisher Scientific*) was dissolved in chloroform (10 mL) and 25% (w/v) aqueous ammonia solution was added. The mixture was stirred for 4 h at rt and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with chloroform (3 x 20 mL). The combined organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. **16a** (1.08 g, 4.73 mmol, 78%) was obtained as a white solid without further purification. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.24 (s, 2H), 2.64 (m, 2H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.35-1.22 (m, 4H), 0.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 146.5, 141.5, 128.6, 125.6, 34.7, 30.7, 30.2, 21.8, 13.8. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₁₂H₂₁N₂O₂S [M+NH₄]⁺: 245.13; found: 245.23.

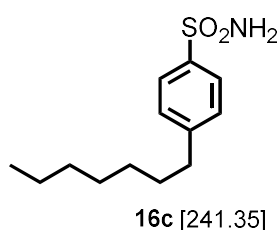
17.3.2 Synthesis of Inhibitor 16b



4-Hexylbenzenesulfonamide (16b): To a solution of hexylbenzene (**19b**, 2.00 g, 12.3 mmol) in chloroform (20 mL), chlorosulfonic acid was added (6.6 mL, 98.6 mmol). The mixture was stirred for 15 h at rt and was poured on ice (200 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 40 mL). The combined organic layer was washed with saturated NaHCO₃-solution (3 x 40 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo. **21b** (2.31 g, 8.84 mmol, 72%) was obtained as a yellow oil without further purification and was directly used for the subsequent condensation reaction. 4-Hexylbenzenesulfonyl chloride (**21b**, 2.29 g, 8.79 mmol) was dissolved in chloroform (15 mL) and 25% (w/v) aqueous

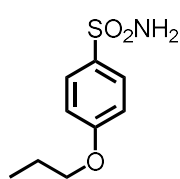
ammonia solution was added. The mixture was stirred for 20 h at rt and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with chloroform (3 x 20 mL). The combined organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 4:1). **16b** (1.28 g, 5.29 mmol, 60%) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.73 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.24 (s, 2H), 2.64 (m, 2H), 1.61-1.54 (m, 2H), 1.30-1.24 (m, 6H), 0.85 (t, J = 7.8 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 146.5, 141.5, 128.6, 125.6, 34.8, 31.0, 30.5, 28.1, 21.9, 13.8. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 259.14; found: 259.21.

17.3.3 Synthesis of Inhibitor 16c



4-Heptylbenzenesulfonamide (16c): To a solution of heptylbenzene (**19c**, 2.00 g, 11.3 mmol) in chloroform (20 mL), chlorosulfonic acid was added (6.0 mL, 90.8 mmol). The mixture was stirred for 15 h at rt and was poured on ice (200 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 40 mL). The combined organic layer was washed with saturated NaHCO_3 -solution (3 x 40 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated in vacuo. 4-Heptylbenzenesulfonyl chloride **21c** was obtained as a yellow oil without further purification and was directly used for the subsequent condensation reaction. **21c** was dissolved in chloroform (15 mL) and 25% (w/v) aqueous ammonia solution was added. The mixture was stirred for 20 h at rt and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with chloroform (3 x 20 mL). The combined organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 3:1). **16c** (2.02 g, 7.91 mmol, 70% over 2 steps) was obtained as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 7.73 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.25 (s, 2H), 2.64 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.61-1.54 (m, 2H), 1.29-1.25 (m, 8H), 0.85 (m, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 147.1, 142.1, 129.1, 126.1, 35.3, 31.7, 31.1, 29.0, 28.9, 22.5, 14.4. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 273.21; found: 273.21.

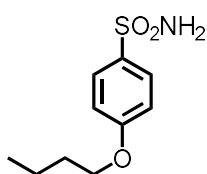
17.3.4 Synthesis of Inhibitor 17a



17a [215.27]

4-n-Propoxybenzenesulfonamide (17a): According to the general procedure **GP1** from section 17.2, sulfonamide **17a** was prepared using **20** (0.700 g, 4.03 mmol), potassium carbonate (0.834 g, 6.04 mmol) and 1-bromopropane (**22a**, 0.55 mL, 6.04 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography over silicagel (cyclohexane/EtOAc, 2:1). **17a** (0.385 g, 1.79 mmol, 44%) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.74 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.07 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.00 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.79-1.70 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 161.0, 136.0, 127.6, 114.3, 69.3, 21.8, 10.2. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 233.09; found: 233.12.

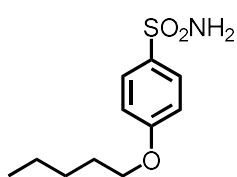
17.3.5 Synthesis of Inhibitor 17b



17b [229.29]

4-n-Butoxybenzenesulfonamide (17b): According to the general procedure **GP1** from section 17.2, sulfonamide **17b** was prepared using **20** (0.700 g, 4.03 mmol), potassium carbonate (0.834 g, 6.04 mmol) and 1-iodobutane (**22b**, 0.46 mL, 6.04 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography over silicagel (cyclohexane/EtOAc, 2:1). **17b** (0.752 g, 3.28 mmol, 81%) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.73 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.07 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.04 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.74-1.67 (m, 2H), 1.48-1.39 (m, 2H), 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 161.0, 136.0, 127.6, 114.3, 67.6, 30.5, 18.6, 13.6. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 247.11; found: 247.17.

17.3.6 Synthesis of Inhibitor 17c

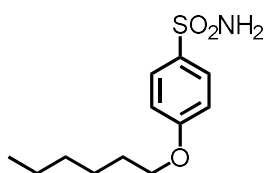


17c [243.32]

4-n-Pentoxybenzenesulfonamide (17c): According to the general procedure **GP1** from section 17.2, sulfonamide **17c** was prepared using **20** (0.700 g, 4.03 mmol), potassium carbonate (0.830 g, 6.04 mmol) and 1-bromopentane (**22c**, 0.75 mL, 6.04 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography over silicagel (cyclohexane/EtOAc, 2:1). **17c** (0.825 g, 3.39 mmol, 84%) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.73 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.03 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.76-1.69 (m, 2H), 1.43-1.30 (m, 4H), 0.90 (t, J = 7.1 Hz,

3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 161.0, 136.0, 127.6, 114.3, 67.8, 28.1, 27.5, 21.8, 13.8. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 261.12; found: 261.14.

17.3.7 Synthesis of Inhibitor 17d



17d [257.35]

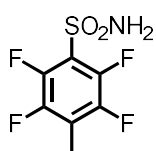
4-n-Hexoxybenzenesulfonamide (17d): According to the general procedure **GP1** from section 17.2, sulfonamide **17d** was prepared using **20** (0.700 g, 4.03 mmol), potassium carbonate (0.830 g, 6.04 mmol) and 1-bromohexane (**22d**, 0.84 mL, 6.04 mmol). The crude product was purified by flash column chromatography over silicagel (cyclohexane/EtOAc, 2:1). **17d** (0.809 g, 3.14 mmol, 78%) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.73 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.06 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.03 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.75-1.68 (m, 2H), 1.45-1.28 (m, 6H), 0.88 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 161.0, 136.0, 127.6, 114.3, 67.9, 30.9, 28.4, 25.0, 22.0, 13.8. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 275.16; found: 275.16.

17.3.8 Synthesis of Inhibitor 18a

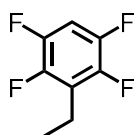


18a [229.15]

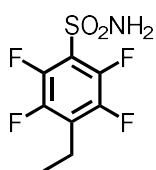
2,3,5,6-Tetrafluorobenzenesulfonamide (18a): According to the general procedure **GP2** from section 17.2, sulfonyl chloride **21a** was prepared using **24a** (1.50 g, 9.99 mmol), chlorosulfonic acid (3.7 mL, 55.5 mmol) and thionyl chloride (**18a** [229.15] (1.6 mL, 22.2 mmol). Sulfonamide **18a** was synthesized according to the general procedure **GP3** using 25% (w/v) aqueous NH_3 -solution (3.7 mL, 49.7 mmol) and THF (25 mL). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 4:1). **18a** (1.49 g, 6.51 mmol, 65% over 2 steps) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.35 (s, 2H), 8.20-8.12 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ = 146.7 (ddd, J = 4.3, 10.4, 14.5 Hz), 144.7 (ddd, J = 4.3, 10.2, 14.8 Hz), 143.6-143.4 (m), 141.5 (dt, J = 3.2, 15.5 Hz), 123.8 (t, J = 15.1 Hz), 110.2 (t, J = 23.6 Hz). MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_6\text{H}_7\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 228.98; found: 229.07.

17.3.9 Synthesis of Inhibitor **18b**

2,3,5,6-Tetrafluoro-4-methylbenzenesulfonamide (18b): According to the general procedure **GP2** from section 17.2, sulfonyl chloride **21b** was prepared using **24b** (0.500 g, 3.04 mmol), chlorosulfonic acid (1.1 mL, 16.7 mmol) and thionyl chloride (0.5 mL, 6.70 mmol). Sulfonamide **18b** was synthesized according to the general procedure **GP3** using 25% (w/v) aqueous NH_3 -solution (1.2 mL, 15.3 mmol) and THF (25 mL). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 4:1). **18b** (0.454 g, 1.86 mmol, 61% over 2 steps) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.29 (s, 2H), 2.29 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 146.0-145.7 (m), 143.6-143.3 (m), 141.0 (dt, J = 3.8, 15.5 Hz), 120.9-120.1 (m), 7.75. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_7\text{H}_9\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 261.03; found: 261.11.

17.3.10 Synthesis of Inhibitor **18c**

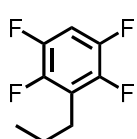
2,3,5,6-Tetrafluoro-4-ethylbenzene (24c): *n*-Butyllithium (1.6 M, 6.9 mL, 10.9 mmol) was added dropwise to a stirred solution of tetrafluorobenzene (**23**, 1.50 g, 9.99 mmol) in THF (50 mL) at -60°C . The mixture was stirred for 2 h at -45°C . Iodoethane (**22b**, 0.8 mL, 10.9 mmol) was added dropwise to the mixture. After 0.5 h the mixture was warmed to rt and poured into water (100 mL). The mixture was extracted with Et_2O (3 x 50 mL) and the combined organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 and Et_2O was removed under atmospheric pressure. The crude product was purified by distillation (up to 140°C). **24c** (1.15 g, 6.48 mmol, 65%) was obtained as a yellow oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.94-6.85 (m, 1H), 2.79-2.69 (m, 2H), 1.25-1.19 (m, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 147.1 (ddd, J = 3.6, 10.2, 14.0 Hz), 146.1-145.8 (m), 144.8-144.5 (m), 143.6-143.4 (m), 123.1 (t, J = 18.4 Hz), 103.4 (t, J = 22.6 Hz), 16.6-16.3 (m), 14.1-14.0 (m). MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_8\text{H}_7\text{F}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 179.05; found: 178.98.



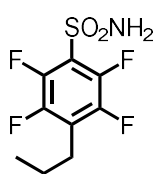
2,3,5,6-Tetrafluoro-4-ethylbenzenesulfonamide (18c): According to the general procedure **GP2** from section 17.2, sulfonyl chloride **21c** was prepared using **24c** (1.14 g, 6.42 mmol), chlorosulfonic acid (2.1 mL, 32.1 mmol) and thionyl chloride (1.0 mL, 14.1 mmol). Sulfonamide **18c** was synthesized according to the general procedure **GP3** using 25% (w/v) aqueous NH_3 -solution (2.0 mL, 26.6 mmol) and THF (40 mL). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/EtOAc, 4:1). **18c** (0.824 g,

3.38 mmol, 53% over 2 steps) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.34 (s, 2H), 2.75 (s, 2H), 1.18 (t, J = 7.6 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 145.4-145.2 (m), 143.5-143.2 (m), 141.3 (dt, J = 3.7, 15.8 Hz), 125.5 (t, J = 18.8 Hz), 121.0 (t, J = 15.3 Hz), 16.2, 13.1. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 275.05; found: 275.09.

17.3.11 Synthesis of Inhibitor 18d

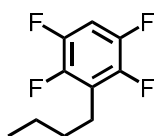


2,3,5,6-Tetrafluoro-4-propylbenzene (24d): *n*-Butyllithium (1.6 M, 6.9 mL, 10.9 mmol) was added dropwise to a stirred solution of tetrafluorobenzene (**23**, 1.50 g, 9.99 mmol) in THF (50 mL) at -60 °C. The mixture was stirred for 2 h at -45 °C. 1-Bromopropane (**22c**, **24d** [192.15] 1.1 mL, 10.9 mmol) was added dropwise to the mixture. After 0.5 h the mixture was warmed to rt and poured into water (100 mL). The mixture was extracted with Et_2O (3 x 50 mL) and the combined organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 and Et_2O was removed under atmospheric pressure. The crude product was purified by distillation (up to 140 °C). **24d** (1.52 g, 7.93 mmol, 79%) was obtained as a yellow oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.94-6.86 (m, 1H), 2.73-2.65 (m, 2H), 1.68-1.57 (m, 2H), 0.98-0.94 (m, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 147.2-146.9 (m), 146.3-145.9 (m), 144.7-144.5 (m), 143.8-143.4 (m), 121.6 (t, J = 18.6 Hz), 103.4 (t, J = 22.7 Hz), 24.9-24.6 (m), 22.7-22.6 (m), 13.7. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{F}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$: 225.09; found: 225.20.



18d [271.23] **2,3,5,6-Tetrafluoro-4-ethylbenzenesulfonamide (18d)**: According to the general procedure **GP2** from section 17.2, sulfonyl chloride **21d** was prepared using **24d** (1.52 g, 7.94 mmol), chlorosulfonic acid (2.9 mL, 43.6 mmol) and thionyl chloride (1.3 mL, 17.4 mmol). Sulfonamide **18d** was synthesized according to the general procedure **GP3** using 25% (w/v) aqueous NH_3 -solution (3.4 mL, 45.4 mmol) and THF (60 mL). The crude product was purified by flash column chromatography (cyclohexane/ EtOAc , 5:1). **18d** (0.107 g, 0.394 mmol, 5% over 2 steps) was obtained as a white-yellow solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.29 (s, 2H), 2.73 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.64-1.56 (m, 2H), 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 145.9-145.6 (m), 143.5-143.2 (m), 141.0 (dt, J = 15.7, 3.7 Hz), 124.0 (t, J = 19.1 Hz), 121.1 (t, J = 15.3 Hz), 24.3, 21.6, 13.2. MS (ESI+) m/z calculated for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 289.06; found: 289.12.

17.3.12 Synthesis of Compound 24e



2,3,5,6-Tetrafluoro-4-butylbenzene (24e): *n*-Butyllithium (1.6 M, 6.9 mL, 10.9 mmol) was added dropwise to a stirred solution of tetrafluorobenzene (**23**, 1.50 g, 9.99 mmol) in THF (50 mL) at -60 °C. The mixture was stirred for 2 h at -45 °C. 1-Bromobutane (**22d**, **24d** [206.18] 1.2 mL, 10.9 mmol) was added dropwise to the mixture. After 0.5 h the mixture was warmed to rt and poured into water (100 mL). The mixture was extracted with Et₂O (3 x 50 mL) and the combined organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and Et₂O was removed under atmospheric pressure. The crude product was purified by distillation (up to 160 °C). **24e** (1.19 g, 5.77 mmol, 58%) was obtained as a brown-yellow oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6.94-6.85 (m, 1H), 2.75-2.67 (m, 2H), 1.62-1.52 (m, 2H), 1.42-1.31 (m, 2H), 0.96-0.91 (m, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 147.3-147.0 (m), 146.3-146.1 (m), 144.8-144.5 (m), 143.8-143.5 (m), 122.1-121.6 (m), 103.6-103.1 (m), 31.5-31.4 (m), 22.8-22.4 (m), 13.8. MS (ESI+) *m/z* calculated for C₁₁H₁₅F₄O [M+MeOH+H]⁺: 239.11; found: 239.05.

18 Appendix

18.1 Omit Maps of Complex Structures with Thrombin and Trypsin from Section 4.2

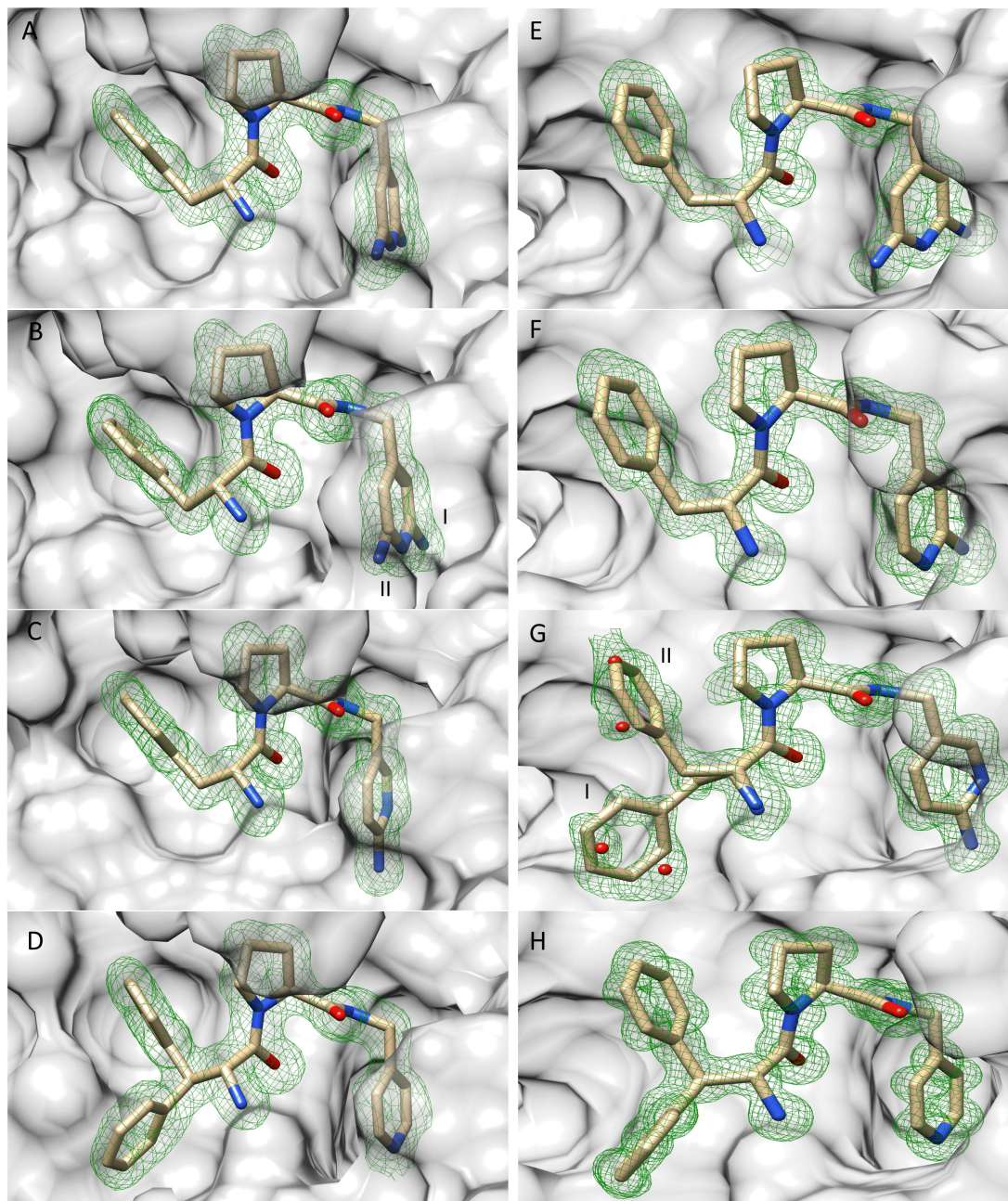


Figure A1: mF_o-DF_c omit maps of ligands **10a** (A), **10b** (B), **10c** (C) and **11** (D) in the S1 pocket of thrombin (left) compared to the structures of trypsin (right) by ligands **10a** (E), **10b** (F), **10c** (G) and **11** (H) are displayed in green at 3σ . Figure A1B shows ligand **10b** with an alternative conformation of the P1 head group in thrombin (occupancy 76% for I and 24% for II). Figure A1G represents ligand **10c** with an alternative conformation of the P3 group in the orthorhombic trypsin structure (group occupancies each to two water molecules for 51% for I and 49% for II). In the other complex structures, all ligand atoms were refined to 100% occupancy. mF_o-DF_c map of ligand **10a** in complex E indicates some additional electron density than expected at the *N*-terminal amino group of the P3 group which we cannot explain.

18.2 Omit Maps of Complex Structures with Thrombin and Trypsin from Section 4.3, 5.4.1 and 5.4.2

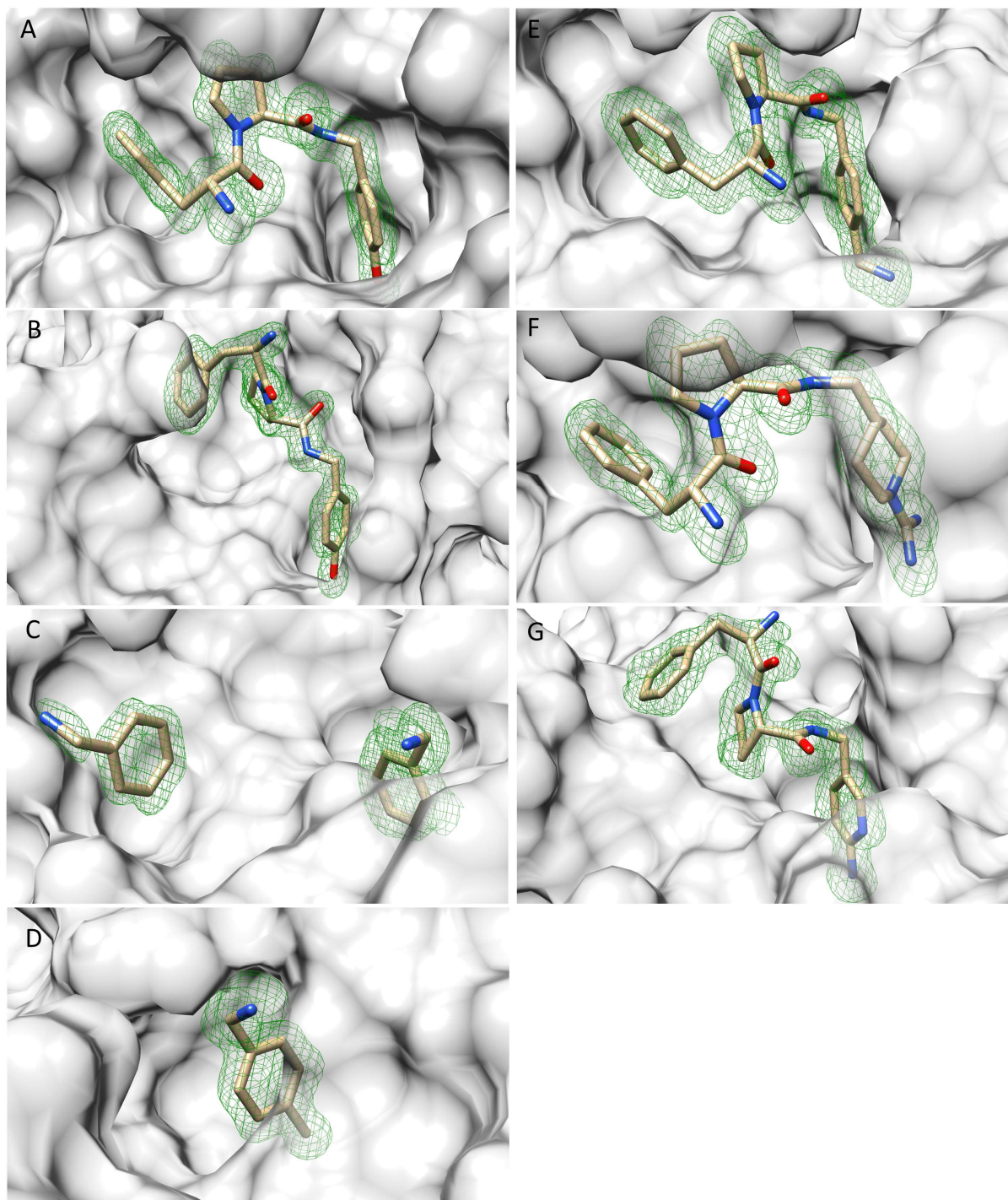


Figure A2: mF_o-DF_c omit maps of ligand **44** (A and B) which is found twice in thrombin. Benzylamine also binds twice in the active site of thrombin (C) and further omit maps of methylbenzylamine (D), **46** (E) and **49** (F) are presented in thrombin. Trypsin complex structure of ligand **10c** in the trigonal space group (G). mF_o-DF_c maps of all structures are displayed in green at 3σ .

18.3 Numbering of Water Molecules

Table A1: Corresponding water molecule numbering from Figure 22 in Section 4.2.

Ligand	Thrombin	Trypsin
10a	W1 = HOH413, W2 = HOH501, W3 = HOH499, W4 = HOH424	W1 = HOH428, W2 = HOH472
10b	W1 = HOH404, W2 = HOH538, W3 = HOH537, W4 = HOH421	W1 = HOH424, W2 = HOH481
10c	W2 = HOH416, W3 = HOH542, W4 = HOH412	W1 = HOH503, W2 = HOH549
11	W1 = HOH406, W2 = HOH550, W4 = HOH461, W5 = HOH423, W6 = HOH515	W1 = HOH413, W2 = HOH458

The numbering of W1-W6 corresponds to the above given numbers in the deposited PDB structures. Water molecules are listed in chain H for thrombin and chain A for trypsin.

Table A2: Corresponding water molecule numbering from Figure 23 and 26 in Section 4.3, Figure 30 and 31 in Section 5.4.1.

Ligand	Thrombin	Trypsin
10c	-	W1 = HOH425, W2 = HOH514
44	W1 = HOH413, W4 = HOH424	-
Benzylamine	W1 = HOH427, W2 = HOH565	-
46	W2 = HOH557, W3 = HOH572, W4 = HOH466	-

The numbering of W1-W4 corresponds to the above given numbers in the deposited PDB structures. Water molecules are listed in chain H for thrombin and chain A for trypsin.

18.4 Thermograms and Binding Isotherms from ITC measurements

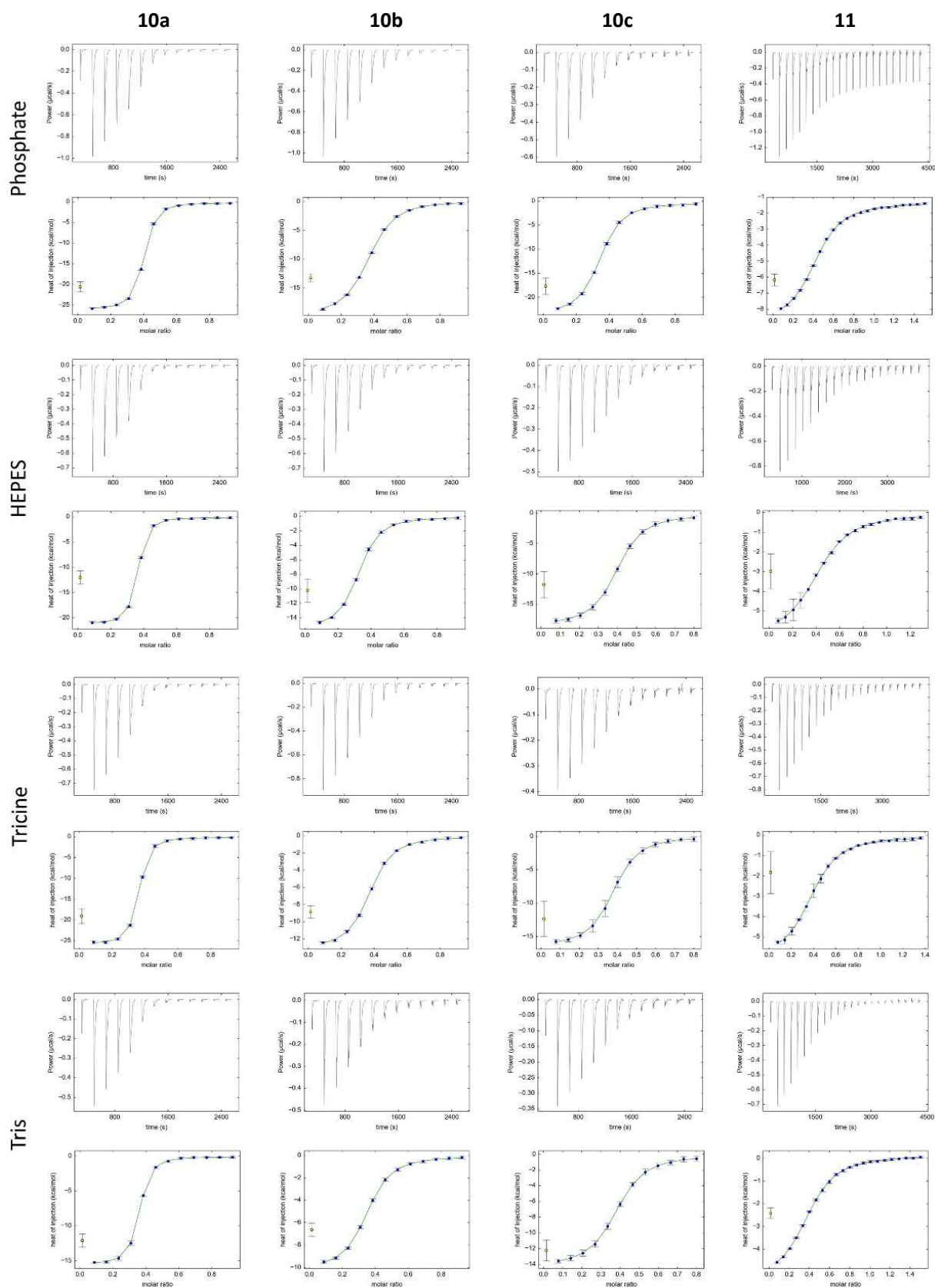


Figure A3: Representative diagrams and isotherms of inhibitor 10a-c and 11 from direct titrations in four different buffers for thrombin.

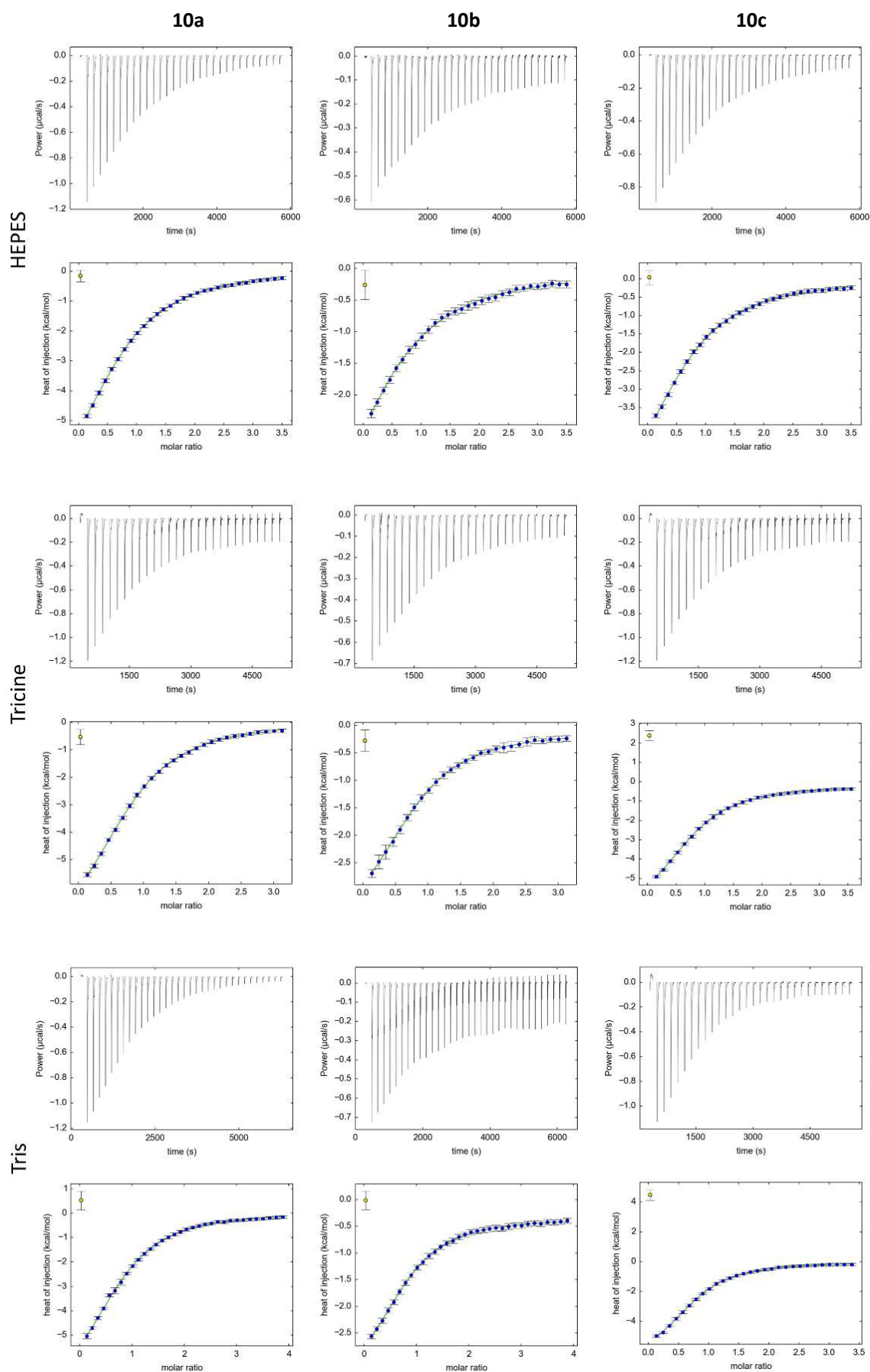
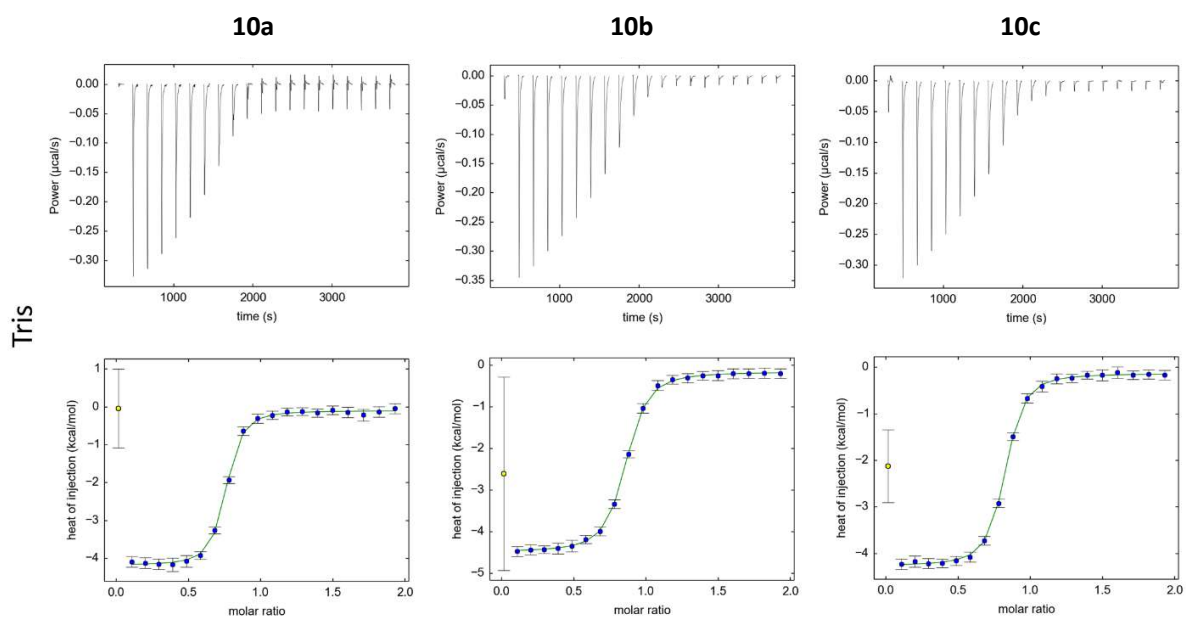


Figure A4: Representative diagrams and isotherms of inhibitor **10a-c** and **11** from direct titrations in three different buffers for trypsin.



Displacement titration of inhibitor **11**:

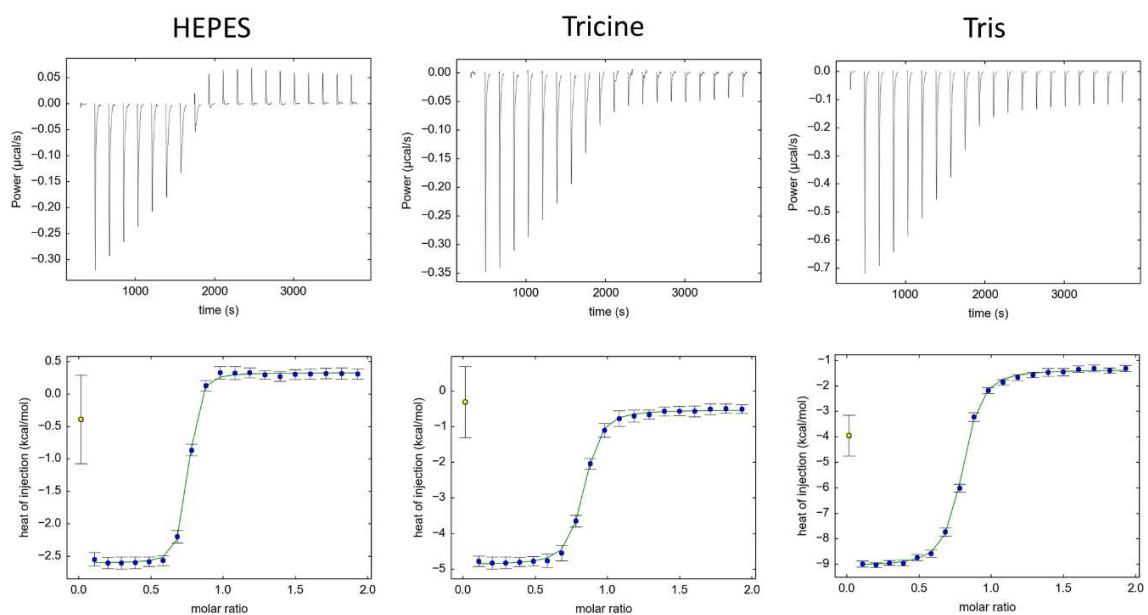
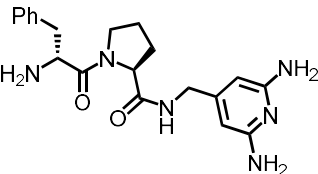
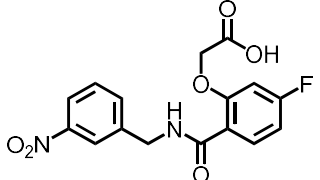
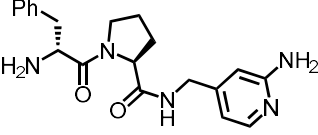
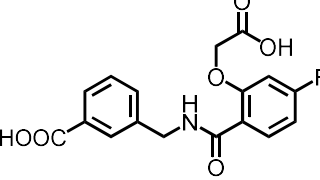
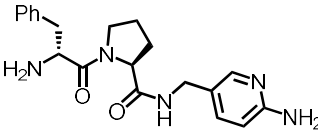
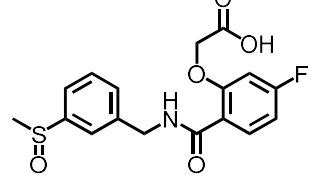
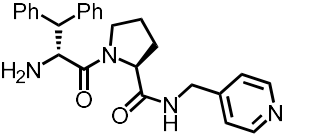
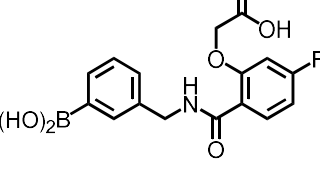
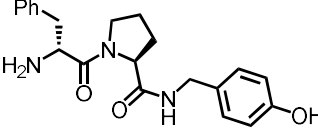
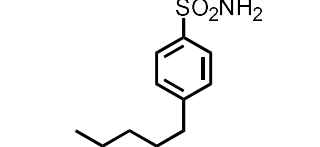
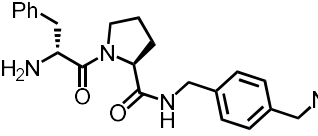
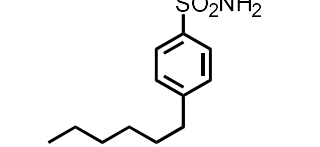
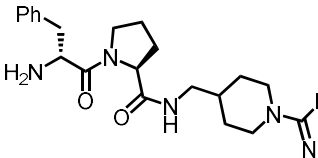
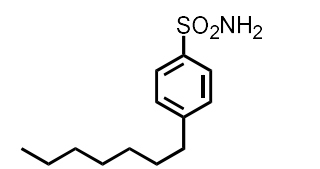


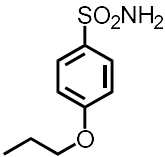
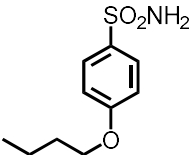
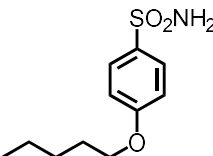
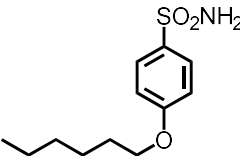

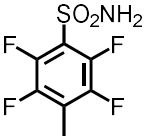
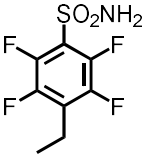

Figure A5: Representative diagrams and isotherms of inhibitor **10a-c** and **11** from displacement titrations in Tris buffer for trypsin. The displacement titration of **11** was performed in three different buffers to obtain the protonation state.

19 Molekülverzeichnis der synthetisierten Inhibitoren

Teil 1 (Kapitel 1-7)			Teil 2 und 3 (Kapitel 8-17)		
Inhibitor	Nummer	Teil	Inhibitor	Nummer	Teil
	10a	1		9^a	2
	10b	1		10^a	2
	10c	1		11	2
	11	1		13b	2
	44	1		16a	3
	46	1		16b	3
	49	1		16c	3

^aDie ALR2-Inhibitoren **9** und **10** wurden bereits für eine frühere Studie von *Rechlin et al.*^[121] von der AG Diederich (Philipps-Universität Marburg) hergestellt.

Teil 3 (Kapitel 13-17)

Inhibitor	Nummer	Teil
	17a	3
	17b	3
	17c	3
	17d	3
	18a	3
	18b	3
	18c	3
	18d	3

20 Literaturverzeichnis

- (1) Davie, E. W.; Kulman, J. D. An Overview of the Structure and Function of Thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* **2006**, 32, 3–15.
- (2) Sabir, I.; Kaivan, K.; Brownrigg, J.; Camm, A. J. Novel Oral Anticoagulants and Exodontia: The Evidence. *Nat. Rev. Cardiol.* **2014**, 222 (11), 290–303.
- (3) Bode, W.; Turk, D.; Karshikov, A. The Refined 1.9-Å X-Ray Crystal Structure of D-Phe-Pro-Arg Chloromethylketone-Inhibited Human α -Thrombin: Structure Analysis, Overall Structure, Electrostatic Properties, Detailed Active-Site Geometry, and Structure-Function Relationships. *Protein Sci.* **1992**, 1 (4), 426–471.
- (4) Milton, T.; Bode, W. The Clot Thickens: Clues Provided by Thrombin Structure. *TIBS* **1995**, 20, 23–28.
- (5) Crawley, J. T. B.; Zanardelli, S.; Chion, C. K. N. K.; Lane, D. A. The Central Role of Thrombin in Hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, 5, 95–101.
- (6) Huntington, J. A. Molecular Recognition Mechanisms of Thrombin. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, 3 (8), 1861–1872.
- (7) Klebe, G. *Wirkstoffdesign*; Spektrum: Berlin Heidelberg, **2013**.
- (8) Orthner, C. L.; Kosow, D. P. Evidence That Human α -Thrombin Is a Monovalent Cation-Activated Enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 202 (1), 63–75.
- (9) Di Cera, E.; Guinto, E. R.; Vindigni, A.; Dang, Q. D.; Ayala, Y. M.; Wuyi, M.; Tulinsky, A. The Na⁺ Binding Site of Thrombin. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (38), 22089–22092.
- (10) Zhang, E.; Tulinsky, A. The Molecular Environment of the Na⁺ Binding Site of Thrombin. *Biophys. Chem.* **1997**, 63, 185–200.
- (11) Huntington, J. A. How Na⁺ Activates Thrombin - A Review of the Functional and Structural Data. *Biol. Chem.* **2008**, 389, 1025–1035.
- (12) Pineda, A. O.; Carrell, C. J.; Bush, L. A.; Prasad, S.; Caccia, S.; Chen, Z. W.; Mathews, F. S.; Di Cera, E. Molecular Dissection of Na⁺ Binding to Thrombin. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (30), 31842–31853.
- (13) Johnson, D. J. D.; Adams, T. E.; Li, W.; Huntington, J. A. Crystal Structure of Wild-Type Human Thrombin in the Na⁺-Free State. *Biochem. J.* **2005**, 392 (1), 21–28.
- (14) Gianni, S.; Ivarsson, Y.; Bah, A.; Bush-Pelc, L. A.; Di Cera, E. Mechanism of Na⁺ Binding to Thrombin Resolved by Ultra-Rapid Kinetics. *Biophys. Chem.* **2007**, 131, 111–114.
- (15) Lyle, T. A. Small-Molecule Inhibitors of Thrombin. **1994**, 1 (1993), 453–460.
- (16) Lehmann, J. Methylene-Bis-(Hydroxycoumarin) Its Use in Thrombosis. *Lancet* **1942**, 1, 318.
- (17) Hirsh, J.; Dalen, J. E.; Anderson, D. R.; Poller, L.; Bussey, H.; Ansell, J.; Deykin, D. Oral

- Anticoagulants : Mechanism of Action , Clinical Effectiveness , and Optimal. *Chest* **2001**, *119*, 8–21.
- (18) Gustafsson, D.; Bylund, R.; Antonsson, T.; Nilsson, I.; Nyström, J.-E.; Eriksson, U.; Bredberg, U.; Teger-Nilsson, A.-C. Case History: A New Oral Anticoagulant: The 50-Year Challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (8), 649–659.
- (19) Harter, K.; Levine, M.; Henderson, S. O. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. *West. J. Emerg. Med.* **2015**, *16* (1), 11–17.
- (20) Hirsh, J.; Shaughnessy, S. G.; Halperin, J. L.; Granger, C.; Ohman, E. M.; Dalen, J. E. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety Jack. *Chest* **2001**, No. 119, 64S–94S.
- (21) F. R. Bettelheim. The Clotting of Fibrinogen. *Biochem. Biophys. Acta* **1956**, *19*, 121–130.
- (22) Stubbs, M. T.; Oschkinat, H.; Mayr, I.; Huber, R.; Angliker, H.; Stone, S. R.; Bode, W. The Interaction of Thrombin with Fibrinogen-A Structural Basis for Its Specificity. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *206* (1), 187–195.
- (23) Eriksson, U. G.; Bredberg, U.; Hoffmann, K.-J.; Thuresson, A.; Gabrielsson, M.; Ericsson, H.; Ahnoff, M.; Gislén, K.; Fager, G.; Gustafsson, D. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Ximelagatran, an Oral Direct Thrombin Inhibitor, in Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31* (3), 294–305.
- (24) *Pharmazeutische Zeitung*; 30. Auflage, Govi-Verlag: Eschborn-Taunus, 2011.
- (25) O’Brien, P. J.; Mureebe, L. Direct Thrombin Inhibitors. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2012**, *17* (1), 5–11.
- (26) Li, M. L.; Ren, Y. J.; Dong, M. H.; Ren, W. X. Design, Synthesis and Structural Exploration of Novel Fluorinated Dabigatran Derivatives as Direct Thrombin Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 122–138.
- (27) Mackman, R. L.; Katz, B. A.; Breitenbucher, J. G.; Hui, H. C.; Verner, E.; Luong, C.; Liu, L.; Sprengeler, P. A. Exploiting Subsite S1 of Trypsin-like Serine Proteases for Selectivity: Potent and Selective Inhibitors of Urokinase-Type Plasminogen Activator. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (23), 3856–3871.
- (28) Grüner, S. *Diplomarbeit*; Marburg, **2012**.
- (29) Brandt, T. *Diplomarbeit*; Marburg, **2008**.
- (30) Sipos, T.; Merkel, J. R. An Effect of Calcium Ions on the Activity, Heat Stability, and Structure of Trypsin. *Biochemistry* **1970**, *9* (14), 2766–2775.
- (31) Turnbull, W. B. *Divided We Fall? Studying Low Affinity Fragments of Ligands by ITC*; GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, **2005**.
- (32) Freyer, M. W.; Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis,

- p>and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions.
- Methods Cell Biol.*
- 2008**
- , 84 (07), 79–113.
- (33) Krimmer, S. G.; Klebe, G. Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions as a Reference for Computational Analysis: How to Assess Accuracy, Reliability and Relevance of Experimental Data. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2015**, 29 (9), 867–883.
 - (34) Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L.-N. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using ITC. **1989**, 137, 131–137.
 - (35) Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. On the Value of c : Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (48), 14859–14866.
 - (36) Sigurskjold, B. W. Exact Analysis of Competition Ligand Binding by Displacement Isothermal Titration Calorimetry. *Anal. Biochem.* **2000**, 277 (2), 260–266.
 - (37) Zhang, Y. L.; Zhang, Z. Y. Low-Affinity Binding Determined by Titration Calorimetry Using a High-Affinity Coupling Ligand: A Thermodynamic Study of Ligand Binding to Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Anal. Biochem.* **1998**, 261 (2), 139–148.
 - (38) Rühmann, E.; Betz, M.; Fricke, M.; Heine, A.; Schäfer, M.; Klebe, G. Thermodynamic Signatures of Fragment Binding: Validation of Direct versus Displacement ITC Titrations. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2015**, 1850 (4), 647–656.
 - (39) Schiebel, J.; Gaspari, R.; Sandner, A.; Ngo, K.; Gerber, H. D.; Cavalli, A.; Ostermann, A.; Heine, A.; Klebe, G. Charges Shift Protonation: Neutron Diffraction Reveals That Aniline and 2-Aminopyridine Become Protonated Upon Binding to Trypsin. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, 56 (17), 4887–4890.
 - (40) Doyle, M. L.; Louie, G.; Dal Monte, P. R.; Sokoloski, T. D. Tight Binding Affinities Determined from Thermodynamic Linkage to Protons by Titration Calorimetry. *Methods Enzym.* **1995**, 259, 183–194.
 - (41) Coussens, N. P.; Schuck, P.; Zhao, H. Strategies for Assessing Proton Linkage to Bimolecular Interactions by Global Analysis of Isothermal Titration Calorimetry Data. *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, 52, 95–107.
 - (42) Brautigam, C. A.; Zhao, H.; Vargas, C.; Keller, S.; Schuck, P. Integration and Global Analysis of Isothermal Titration Calorimetry Data for Studying Macromolecular Interactions. *Nat. Protoc.* **2016**, 11 (5), 882–894.
 - (43) Baker, B. M.; Murphy, K. P. Evaluation of Linked Protonation Effects in Protein Binding Reactions Using Isothermal Titration Calorimetry. *Biophys. J.* **1996**, 71 (4), 2049–2055.
 - (44) Baum, B.; Muley, L.; Heine, A.; Smolinski, M.; Hangauer, D.; Klebe, G. Think Twice: Understanding the High Potency of Bis(Phenyl)Methane Inhibitors of Thrombin. *J. Mol. Biol.* **2009**, 391 (3), 552–564.

- (45) Braun, F. *Masterarbeit*; Marburg, **2014**.
- (46) Ngo, K. *Masterarbeit*; Marburg, **2016**.
- (47) Schiebel, J.; Gaspari, R.; Wulsdorf, T.; Ngo, K.; Sohn, C.; Schrader, T. E.; Cavalli, A.; Ostermann, A.; Heine, A.; Klebe, G. Intriguing Role of Water in Protein-Ligand Binding Studied by Neutron Crystallography on Trypsin Complexes. *Nat. Commun.* **2018**, 9 (1), 3559.
- (48) Muley, L.; Baum, B.; Smolinski, M.; Freindorf, M.; Heine, A.; Klebe, G.; Hangauer, D. G. Enhancement of Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bond Strength by Cooperativity: Synthesis, Modeling, and Molecular Dynamics Simulations of a Congeneric Series of Thrombin Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (5), 2126–2135.
- (49) Fox, B. A.; Threlfall, T. L. 2,3-Diaminopyridine. *Org. Synth.* **1964**, 44, 34.
- (50) Bonacorso, H. G.; Lourega, R. V.; Righi, F. J.; Deon, E. D.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. Preparation of New 2-Amino- and 2,3-Diamino-Pyridine Trifluoroacetyl Enamine Derivatives and Their Application to the Synthesis of Trifluoromethyl-Containing 3H-Pyrido[2,3-b][1,4] Diazepinols. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, 45 (6), 1679–1686.
- (51) Bakke, J. M.; Riha, J. Synthesis of 3,4-Diaminopyridine and Imidazo[4,5-c]Pyridines by Nitration of 4-Acylaminopyridines. *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, 36 (5), 1143–1145.
- (52) Gaillard, S.; Elmkaddem, M. K.; Fischmeister, C.; Thomas, C. M.; Renaud, J. L. Highly Efficient and Economic Synthesis of New Substituted Amino-Bispyridyl Derivatives via Copper and Palladium Catalysis. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49 (21), 3471–3474.
- (53) Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; 1. Auflage, Pergamon Press: Oxford, New York, **1996**.
- (54) Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V.; Taylor, R. J. K. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; 1. Auflage, Elsevier: Amsterdam, **2008**.
- (55) Nabati, M.; Mahkam, M. One-Pot and One-Step Novel N-Methylation of 2,6-Diaminopyridine. *Iran. Chem. Commun.* **2014**, 2, 162–167.
- (56) Lakem, A. E.; Mgadiugha, N. C.; Ogechukwu, U. M. Synthesis and Characterization of New Complex Heterocyclic Ring Systems of Industrial Importance. *Am. J. Heterocycl. Chem.* **2017**, 2 (1), 26–31.
- (57) Mastalir, M.; Pittenauer, E.; Allmaier, G.; Kirchner, K. 2,6-Diamination of Substituted Pyridines via Heterogeneous Chichibabin Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57 (3), 333–336.
- (58) Elmkaddem, M. K.; Fischmeister, C.; Thomas, C. M.; Renaud, J.-L. Efficient Synthesis of Aminopyridine Derivatives by Copper Catalyzed Amination Reactions. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (6), 925–927.
- (59) Brodbeck, B.; Nettekoven, M. H. Substituted[1,2,4]Triazolo[1,5A]Pyridine Derivatives with Activity as Adenosine Receptor Ligands U.S. Patent 6,506,772 B1, **2003**.

- (60) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*; 2. Auflage, Oxford University Press: New York, **2012**.
- (61) Banerjee, S.; Voit, B.; Heinrich, G.; Böhme, F. A New Versatile Synthesis of 4-Substituted Diaminopyridine Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53 (17), 2236–2238.
- (62) Ullmann, F.; Bielecki, J. Ueber Synthesen in der Biphenylreihe. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34 (2), 2174–2185.
- (63) Wolf, C.; Liu, S.; Mei, X.; August, A. T.; Casimir, M. D. Regioselective Copper-Catalyzed Amination of Bromobenzoic Acids Using Aliphatic and Aromatic Amines. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (8), 3270–3273.
- (64) Buck, E.; Song, Z. J. Preparation of 1-Methoxy-2-(4-Methoxyphenoxy)Benzene. *Org. Synth.* **2005**, 69–74.
- (65) Monnier, F.; Taillefer, M. Katalytische C-C-, C-N- Und C-O-Ullmann-Kupplungen. *Angew. Chemie* **2009**, 121 (38), 7088–7105.
- (66) Sambiagio, C.; Marsden, S. P.; Blacker, a J.; McGowan, P. C. Copper Catalysed Ullmann Type Chemistry: From Mechanistic Aspects to Modern Development. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (10), 3525–3550.
- (67) Beierlein, C. H.; Breit, B.; Paz Schmidt, R. A.; Plattner, D. A. Online Monitoring of Hydroformylation Intermediates by ESI-MS. *Organometallics* **2010**, 29 (11), 2521–2532.
- (68) Ariza, X.; Urpí, F.; Viladomat, C.; Vilarrasa, J. One-Pot Conversion of Azides to Boc-Protected Amines with Trimethylphosphine and Boc-ON. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (49), 9101–9102.
- (69) Ariza, X.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. A Practical Procedure for the Preparation of Carbamates from Azides. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 (42), 7515–7517.
- (70) Strieter, E. R.; Blackmond, D. G.; Buchwald, S. L. The Role of Chelating Diamine Ligands in the Goldberg Reaction: A Kinetic Study on the Copper-Catalyzed Amidation of Aryl Iodides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (12), 4120–4121.
- (71) Kiyomori, A.; Marcoux, J.; Buchwald, S. L. An Efficient Copper-Catalyzed Coupling of Aryl Halides with Lmidazoles. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2657–2660.
- (72) Kelkar, A. A.; Patil, N. M.; Chaudhari, R. V. Copper-Catalyzed Amination of Aryl Halides: Single-Step Synthesis of Triarylamines. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43 (40), 7143–7146.
- (73) McPherson, A.; Gavira, J. A. Introduction to Protein Crystallization. *Acta Crystallogr. Sect. FStructural Biol. Commun.* **2014**, 70 (1), 2–20.
- (74) Gey, M. H. *Bioanalytik*; 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **2015**.
- (75) Shi, Y. A Glimpse of Structural Biology through X-Ray Crystallography. *Cell* **2014**, 159 (5), 995–1014.
- (76) Blow, D. *Outline of Crytallography for Biologists*; Oxford University Press, **2002**.

- (77) Guvench, O.; Price, D. J.; Brooks, C. L. Receptor Rigidity and Ligand Mobility in Trypsin-Ligand Complexes. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2005**, *58* (2), 407–417.
- (78) Wu, E. L.; Han, K. L.; Zhang, J. Z. H. Selectivity of Neutral/Weakly Basic P1 Group Inhibitors of Thrombin and Trypsin by a Molecular Dynamics Study. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (28), 8704–8714.
- (79) Hilpert, K.; Ackermann, J.; Banner, D. W.; Gast, A.; Gubernator, K.; Hadvary, P.; Labler, L.; Muller, K.; Schmid, G.; Tschopp, T. B.; et al. Design and Synthesis of Potent and Highly Selective Thrombin Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (23), 3889–3901.
- (80) Sichler, K.; Hopfner, K. P.; Kopetzki, E.; Huber, R.; Bode, W.; Brandstetter, H. The Influence of Residue 190 in the S1 Site of Trypsin-like Serine Proteases on Substrate Selectivity Is Universally Conserved. *FEBS Lett.* **2002**, *530* (1–3), 220–224.
- (81) Biela, A.; Khayat, M.; Tan, H.; Kong, J.; Heine, A.; Hangauer, D.; Klebe, G. Impact of Ligand and Protein Desolvation on Ligand Binding to the S1 Pocket of Thrombin. *J. Mol. Biol.* **2012**, *418* (5), 350–366.
- (82) Collins, C. *Masterarbeit*; Marburg, **2015**.
- (83) Weimer, D. *Masterarbeit*; Marburg, **2013**.
- (84) Betz, M.; Wulsdorf, T.; Krimmer, S. G.; Klebe, G. Impact of Surface Water Layers on Protein-Ligand Binding: How Well Are Experimental Data Reproduced by Molecular Dynamics Simulations in a Thermolysin Test Case? *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56* (1), 223–233.
- (85) Ladbury, J. E. Just Add Water! The Effect of Water on the Specificity of Protein- Ligand Binding Sites and Its Potential Application to Drug Design. *Chem. Biol.* **1996**, *3* (12), 973–980.
- (86) Levy, Y.; Onuchic, J. N. Water Mediation in Protein Folding and Molecular Recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 389–415.
- (87) Lobo, A. P.; Wos, J. D.; Yu, S. M.; Lawson, W. B. Active Site Studies of Human Thrombin and Bovine Trypsin: Peptide Substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *177* (1), 235–244.
- (88) Fukada, H.; Takahashi, K. Enthalpy and Heat Capacity Changes for the Proton Dissociation of Various Buffer Components in 0.1 M Potassium Chloride. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, *33* (2), 159–166.
- (89) Goldberg, R. N.; Kishore, N.; Lennen, R. M. Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, *31* (2), 231–370.
- (90) Baum, B.; Mohamed, M.; Zayed, M.; Gerlach, C.; Heine, A.; Hangauer, D.; Klebe, G. More than a Simple Lipophilic Contact: A Detailed Thermodynamic Analysis of Nonbasic Residues in the S1 Pocket of Thrombin. *J. Mol. Biol.* **2009**, *390* (1), 56–69.
- (91) Dullweber, F.; Stubbs, M. T.; Musil, D.; Sturzebecher, J.; Klebe, G. Factorising Ligand Affinity: A Combined Thermodynamic and Crystallographic Study of Trypsin and Thrombin Inhibition. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313* (3), 593–614.

- (92) Czodrowski, P.; Sottriffer, C. A.; Klebe, G. Protonation Changes upon Ligand Binding to Trypsin and Thrombin: Structural Interpretation Based on pK_a Calculations and ITC Experiments. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367* (5), 1347–1356.
- (93) Baum, B.; Muley, L.; Heine, A.; Smolinski, M.; Hangauer, D.; Klebe, G. Think Twice: Understanding the High Potency of Bis(Phenyl)Methane Inhibitors of Thrombin. *J. Mol. Biol.* **2009**, *391* (3), 552–564.
- (94) Baum, B.; Muley, L.; Smolinski, M.; Heine, A.; Hangauer, D.; Klebe, G. Non-Additivity of Functional Group Contributions in Protein-Ligand Binding: A Comprehensive Study by Crystallography and Isothermal Titration Calorimetry. *J. Mol. Biol.* **2010**, *397* (4), 1042–1054.
- (95) Biela, A.; Sielaff, F.; Terwesten, F.; Heine, A.; Steinmetzer, T.; Klebe, G. Ligand Binding Stepwise Disrupts Water Network in Thrombin: Enthalpic and Entropic Changes Reveal Classical Hydrophobic Effect. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (13), 6094–6110.
- (96) Sandner, A.; Hüfner-Wulsdorf, T.; Heine, A.; Steinmetzer, T.; Klebe, G.; Weg, M. Strategies for Late-Stage Optimization: Profiling Thermodynamics by Preorganization and Salt Bridge Shielding. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 9753–9771.
- (97) Ladbury, J. E.; Klebe, G.; Freire, E. Adding Calorimetric Data to Decision Making in Drug Development: A Hot Tip! *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (1), 23–27.
- (98) Page, M. J.; Macgillivray, R. T. A.; Di Cera, E. Determinants of Specificity in Coagulation Proteases. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3* (11), 2401–2408.
- (99) Hall, H. K. Correlation of the Base Strengths of Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (20), 5441–5444.
- (100) Rühmann, E.; Betz, M.; Heine, A.; Klebe, G. Fragment Binding Can Be Either More Enthalpy-Driven or Entropy-Driven: Crystal Structures and Residual Hydration Patterns Suggest Why. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (17), 6960–6971.
- (101) Das, J.; Kimball, S. D.; Hall, S. E.; Han, W. C.; Iwanowicz, E.; Lin, J.; Moquin, R. V.; Reid, J. a; Sack, J. S.; Malley, M. F.; et al. Molecular Design and Structure-Activity Relationships Leading to the Potent, Selective, and Orally Active Thrombin Active Site Inhibitor BMS-189664. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (1), 45–49.
- (102) Laurini, E.; Marson, D.; Dal Col, V.; Fermeiglia, M.; Mamolo, M. G.; Zampieri, D.; Vio, L.; Pricl, S. Another Brick in the Wall. Validation of the σ_1 Receptor 3D Model by Computer-Assisted Design, Synthesis, and Activity of New σ_1 Ligands. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (11), 3107–3126.
- (103) Stürzebecher, J.; Stürzebecher, U.; Vieweg, H.; Wagner, G.; Hauptmann, J.; Markwardt, F. Synthetic Inhibitors of Bovine Factor Xa and Thrombin Comparison of Their Anticoagulant Efficiency. *Thromb. Res.* **1989**, *54* (3), 245–252.
- (104) Schönherr, D.; Wollatz, U.; Haznar-Garbacz, D.; Hanke, U.; Box, K. J.; Taylor, R.; Ruiz, R.; Beato,

- S.; Becker, D.; Weitschies, W. Characterisation of Selected Active Agents Regarding pK_a Values, Solubility Concentrations and pH Profiles by SiriusT3. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *92*, 155–170.
- (105) Keller, S.; Vargas, C.; Zhao, H.; Piszczek, G.; Brautigam, C. A.; Schuck, P. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5066–5073.
- (106) Scheuermann, T. H.; Brautigam, C. A. High-Precision, Automated Integration of Multiple Isothermal Titration Calorimetric Thermograms: New Features of NITPIC. *Methods* **2015**, *76*, 87–98.
- (107) Kabsch, W. Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post-Refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 133–144.
- (108) Sparta, K. M.; Krug, M.; Heinemann, U.; Mueller, U.; Weiss, M. S. XDSAPP2.0. **2016**, 1085–1092.
- (109) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- (110) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; et al. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 213–221.
- (111) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of *Coot*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (4), 486–501.
- (112) Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291.
- (113) Kleywegt, G. J. *MOLEMAN* - Unpublished Program; Uppsala University: Uppsala.
- (114) Kleywegt, G. J.; Zou, J. Y.; Kjeldgaard, M.; Jones, T. A. *International Tables for Crystallography: Crystallography of Biological Macromolecules*; Rossmann, M. G., Arnold, E., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, **2001**; Vol. F.
- (115) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7512–7515.
- (116) El-Kabbani, O.; Wilson, D. K.; Petrash, M.; Quiocho, F. A. Structural Features of the Aldose Reductase and Aldehyde Reductase Inhibitor-Binding Sites. *Mol. Vis.* **1998**, *4*, 19.
- (117) Singh Grewal, A.; Bhardwaj, S.; Pandita, D.; Lather, V.; Singh Sekhon, B. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-Diabetic Diseases. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2016**, *16*, 120–162.
- (118) Tang, W. H.; Martin, K. A.; Hwa, J. Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 1–8.

- (119) Yabe-Nishimura, C. Aldose Reductase in Glucose Toxicity : A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50* (1), 21–33.
- (120) Wilson, D. K.; Bohren, K. M.; Gabbay, K. H.; Quiocho, F. A. An Unlikely Sugar Substrate Site in the 1.65 Å Structure of the Human Aldose Reductase Holoenzyme Implicated in Diabetic Complications. *Science* **1992**, *257* (5066), 81–84.
- (121) Rechlin, C.; Scheer, F.; Terwesten, F.; Wulsdorf, T.; Pol, E.; Fridh, V.; Toth, P.; Diederich, W. E.; Heine, A.; Klebe, G. Price for Opening the Transient Specificity Pocket in Human Aldose Reductase upon Ligand Binding: Structural, Thermodynamic, Kinetic, and Computational Analysis. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (5), 1397–1415.
- (122) Várnai, P.; Warshel, A. Computer Simulation Studies of the Catalytic Mechanism of Human Aldose Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (16), 3849–3860.
- (123) Tarle, I.; Borhani, D. W.; Wilson, D. K.; Quiocho, F. A.; Petrash, J. M. Probing the Active Site of Human Aldose Reductase. *Evaluation* **1993**, *268* (34), 25687–25693.
- (124) Bohren, K. M.; Grimshaw, C. E.; Lai, C. J.; Gabbay, K. H.; Harrison, D. H.; Ringe, D.; Petsko, G. A. Tyrosine-48 Is the Proton Donor and Histidine-110 Directs Substrate Stereochemical Selectivity in the Reduction Reaction of Human Aldose Reductase: Enzyme Kinetics and Crystal Structure of the Y48H Mutant Enzyme. *Biochemistry* **1994**, *33* (8), 2021–2032.
- (125) Ruiz, F.; Hazemann, I.; Mitschler, A.; Joachimiak, A.; Schneider, T.; Karplus, M.; Podjarny, A. The Crystallographic Structure of the Aldose Reductase-IDD552 Complex Shows Direct Proton Donation from Tyrosine 48. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (8), 1347–1354.
- (126) Dréanic, M. P.; Edge, C. M.; Tuttle, T. New Insights into the Catalytic Mechanism of Aldose Reductase: A QM/MM Study. *ACS Omega* **2017**, *2* (9), 5737–5747.
- (127) Lee, Y. S.; Hodoscek, M.; Brooks, B. R.; Kador, P. F. Catalytic Mechanism of Aldose Reductase Studied by the Combined Potentials of Quantum Mechanics and Molecular Mechanics. *Biophys. Chem.* **1998**, *70* (3), 203–216.
- (128) Grimshaw, C. E.; Bohren, K. M.; Lai, C. J.; Gabbay, K. H. Human Aldose Reductase: Rate Constants for a Mechanism Including Interconversion of Ternary Complexes by Recombinant Wild-Type Enzyme. *Biochemistry* **1995**, *34* (44), 14356–14365.
- (129) Eisenmann, M.; Steuber, H.; Zentgraf, M.; Altenkämper, M.; Ortmann, R.; Perruchon, J.; Klebe, G.; Schlitzer, M. Structure-Based Optimization of Aldose Reductase Inhibitors Originating from Virtual Screening. *ChemMedChem* **2009**, *4* (5), 809–819.
- (130) Bohren, K. M.; Grimshaw, C. E.; Gabbay, K. H. Catalytic Effectiveness of Human Aldose Reductase. Critical Role of C- Terminal Domain. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (29), 20965–20970.
- (131) Krämer, O. *Dissertation*; Marburg, **2003**.
- (132) El-Kabbani, O.; Darmanin, C.; Schneider, T. R.; Hazemann, I.; Ruiz, F.; Oka, M.; Joachimiak, A.;

- Schulze-Briese, C.; Tomizaki, T.; Mitschler, A.; et al. Ultrahigh Resolution Drug Design. II. Atomic Resolution Structures of Human Aldose Reductase Holoenzyme Complexed with Fidarestat and Minalrestat: Implications for the Binding of Cyclic Imide Inhibitors. *Proteins Struct. Funct. Bioinformatics* **2004**, *55* (4), 805–813.
- (133) Spielberg, S. P.; Shear, N. H.; Cannon, M.; Hutson, N. J.; Gunderson, K. In-Vitro Assessment of a Hypersensitivity Syndrome Associated with Sorbinil. *Ann. Intern. Med.* **1991**, *114* (9), 720–724.
- (134) Mucke, H. A. M.; Mucke, E.; Mucke, P. M. Aldose Reductase Inhibitors for Diabetic Cataract: A Study of Disclosure Patterns in Patents and Peer Review Papers. *Ophthalmol. Res. An Int. J.* **2014**, *2* (3), 137–149.
- (135) Ley, M. *Masterarbeit*; Marburg, **2017**.
- (136) Hubert, L.-S. *Masterarbeit*; Marburg, **2019**.
- (137) Terauchi, J.; Hideyuki, O.; Sato, K. Substituted 2-Amidoquinazol-4-Ones as Matrix Metalloproteinase-13 Inhibitors U.S. Patent 329556 A1, **2015**.
- (138) Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Application of Named Reactions in Organic Synthesis*; 1. Auflage, Elsevier Academic Press, **2005**.
- (139) Bahrami, K.; Khodaei, M. M.; Sheikh Arabi, M. TAPC-Promoted Oxidation of Sulfides and Deoxygenation of Sulfoxides. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (18), 6208–6213.
- (140) Clark, T.; Murray, J. S.; Lane, P.; Politzer, P. Why Are Dimethyl Sulfoxide and Dimethyl Sulfone Such Good Solvents? *J. Mol. Model.* **2008**, *14* (8), 689–697.
- (141) Van Zandt, M. C.; Sibley, E. O.; McCann, E. E.; Combs, K. J.; Flam, B.; Sawicki, D. R.; Sabetta, A.; Carrington, A.; Sredy, J.; Howard, E.; et al. Design and Synthesis of Highly Potent and Selective (2-Arylcabamoyl-Phenoxy)-Acetic Acid Inhibitors of Aldose Reductase for Treatment of Chronic Diabetic Complications. *Bioorganic Med. Chem.* **2004**, *12* (21), 5661–5675.
- (142) Supuran, C. T. Structure and Function of Carbonic Anhydrases. *Biochem. J.* **2016**, *473* (14), 2023–2032.
- (143) Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23* (2), 146–189.
- (144) Tripp, B. C.; Bell, C. B.; Cruz, F.; Krebs, C.; Ferry, J. G. A Role for Iron in an Ancient Carbonic Anhydrase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (8), 6683–6687.
- (145) Xu, Y.; Feng, L.; Jeffrey, P. D.; Shi, Y.; Morel, F. M. M. Structure and Metal Exchange in the Cadmium Carbonic Anhydrase of Marine Diatoms. *Nature* **2008**, *452* (7183), 56–61.
- (146) Supuran, C. T. Structure-Based Drug Discovery of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, *27* (6), 759–772.
- (147) Abdoli, M.; Angeli, A.; Bozdog, M.; Carta, F.; Kakanejadifard, A.; Saeidian, H.; Supuran, C. T. Synthesis and Carbonic Anhydrase I, II, VII, and IX Inhibition Studies with a Series of

- Benzo[d]Thiazole-5- and 6-Sulfonamides. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, 32 (1), 1071–1078.
- (148) Del Prete, S.; Vullo, D.; Fisher, G. M.; Andrews, K. T.; Poulsen, S. A.; Capasso, C.; Supuran, C. T. Discovery of a New Family of Carbonic Anhydrases in the Malaria Pathogen *Plasmodium Falciparum* - The η -Carbonic Anhydrases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (18), 4389–4396.
- (149) Abt, G.; Wang, B.; Wang, J.; Zhang, W.; Meldrum, D. R.; Biller, S. J.; Schubotz, F.; Roggensack, S. E.; Thompson, A. W.; Summons, R. E.; et al. A Novel Evolutionary Lineage of Carbonic Anhydrase (Epsilon Class) Is a Component of the Carboxysome Shell. *J. Bacteriol.* **2004**, 186 (3), 623–630.
- (150) Carta, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A. Sulfonamides and Their Isosters as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Future Med. Chem.* **2014**, 6 (10), 1149–1165.
- (151) Eriksson, A. E.; Jones, T. A.; Liljas, A. Refined Structure of Human Carbonic Anhydrase II at 2.0 Å Resolution. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1988**, 4, 274–282.
- (152) Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chem. Rev.* **2012**, 112 (8), 4421–4468.
- (153) Glöckner, S. *Masterarbeit*; Marburg, **2016**.
- (154) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (2), 168–181.
- (155) Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein-Ligand Binding. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (3), 946–1051.
- (156) Innocenti, A.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Scozzafava, A.; Simone, G. De; Supuran, C. T. The Proteoglycan Region of the Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isoform IX Acts as Anintrinsic Buffer Optimizing CO₂ Hydration at Acidic PH Values Characteristic of Solid Tumors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, 19 (20), 5825–5828.
- (157) Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, 19 (3), 199–229.
- (158) Mann, T.; Keilin, D. Sulphanilamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase. *Nature* **1940**, 146, 164–165.
- (159) Supuran, C. T. How Many Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanisms Exist? *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, 31 (3), 345–360.
- (160) Sugrue, M. F. Pharmacological and Ocular Hypotensive Properties of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Prog. Retin. Eye Res.* **2000**, 19 (1), 87–112.
- (161) Gaspari, R.; Rechlin, C.; Heine, A.; Bottegoni, G.; Rocchia, W.; Schwarz, D.; Bomke, J.; Gerber, H.

- D.; Klebe, G.; Cavalli, A. Kinetic and Structural Insights into the Mechanism of Binding of Sulfonamides to Human Carbonic Anhydrase by Computational and Experimental Studies. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (9), 4245–4256.
- (162) Abbate, F.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: X-Ray Crystallographic Structure of the Adduct of Human Isozyme II with the Perfluorobenzoyl Analogue of Methazolamide. Implications for the Drug Design of Fluorinated Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18* (4), 303–308.
- (163) De Leval, X.; Ilies, M.; Casini, A.; Dogné, J. M.; Scozzafava, A.; Masini, E.; Mincione, F.; Starnotti, M.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Topical Intraocular Pressure Lowering Effects of Fluorine-Containing Inhibitors Devoid of Enhanced Reactivity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (11), 2796–2804.
- (164) Carta, F.; Di Cesare Mannelli, L.; Pinard, M.; Ghelardini, C.; Scozzafava, A.; McKenna, R.; Supuran, C. T. A Class of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors with Neuropathic Pain Modulating Effects. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (8), 1828–1840.
- (165) Ahad, A. M.; Zuohe, S.; Du-Cuny, L.; Moses, S. A.; Zhou, L. L.; Zhang, S.; Powis, G.; Meuillet, E. J.; Mash, E. A. Development of Sulfonamide AKT PH Domain Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, *19*, 2046–2054.
- (166) Moldoveanu, C.; Wilson, D. A.; Wilson, C. J.; Leowanawat, P.; Resmerita, A. M.; Liu, C.; Rosen, B. M.; Percec, V. Neopentylglycolborylation of Ortho-Substituted Aryl Halides Catalyzed by NiCl₂-Based Mixed-Ligand Systems. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (16), 5438–5452.
- (167) Lin, S.; Danishefsky, S. J. The Total Synthesis of Proteasome Inhibitors TMC-95A and TMC-95B: Discovery of a New Method To Generate Cis-Propenyl Amides. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (3), 512–515.
- (168) Zhu, B.; Panek, J. S. Total Synthesis of Epothilone A. **2000**, *2* (17), 2575–2578.
- (169) Lee, N. R.; Linstadt, R. T. H.; Gloisten, D. J.; Gallou, F.; Lipshutz, B. H. B-Alkyl Sp³-Sp² Suzuki-Miyaura Couplings under Mild Aqueous Micellar Conditions. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 2902–2905.
- (170) Nguyen, H. N.; Huang, X.; Buchwald, S. L. The First General Palladium Catalyst for the Suzuki-Miyaura and Carbonyl Enolate Coupling of Aryl Arenesulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (39), 11818–11819.
- (171) Braun, F. *Dissertation*; Marburg, **2017**.
- (172) Yang, C.-T.; Zhang, Z.-Q.; Liu, Y.; Liu, L. Copper-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Organoboron Compounds with Primary Alkyl Halides and Pseudohalides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 3904–3907.
- (173) Cahiez, G.; Chaboche, C.; Duplais, C.; Moyeux, A. A New Efficient Catalytic System for the Cross-Coupling of Aryl Grignard Reagents with Primary and Secondary Alkyl Bromides. *Org. Lett.* **2009**,

11 (2), 277–280.

- (174) Dudutienė, V.; Zubriene, A.; Smirnov, A.; Gylyte, J.; Timm, D.; Manakova, E.; Gražulis, S.; Matulis, D. 4-Substituted-2,3,5,6-Tetrafluorobenzenesulfonamides as Inhibitors of Carbonic Anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, 21, 2093–2106.
- (175) Glöckner, S. *Doktorarbeit*; Marburg, **2020**.



Lebenslauf

Aus Gründen des Persönlichkeitsschutzes wird von der elektronischen Veröffentlichung des Lebenslaufes abgesehen.

Publikationen

5. S. Glöckner, K. Ngo, B. Wagner, A. Heine, G. Klebe, **The Influence of Varying Fluorination Patterns on the Thermodynamics and Kinetics of Benzenesulfonamide Binding to Human Carbonic Anhydrase II**, *Manuskript in Bearbeitung*.
4. K. Ngo, C. Collins-Kautz, S. Gerstenecker, B. Wagner, A. Heine, G. Klebe, **Protein-induced Change in Ligand Protonation during Trypsin and Thrombin Binding: Hint on Differences in Selectivity?**, *J. Med. Chem.* **2020**, *Manuskript in Begutachtung*.
3. S. Glöckner, K. Ngo, C. P. Sager, T. Hüfner, A. Heine, G. Klebe, **Conformational Changes in Alkyl Chains Determine the Thermodynamic and Kinetic Binding Profiles of Carbonic Anhydrase Inhibitors and Reveal Effects of Improved Shape Complementarity**, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *Manuskript in Begutachtung*.
2. J. Schiebel, R. Gaspari, T. Wulsdorf, K. Ngo, C. Sohn, T. E. Schrader, A. Cavalli, A. Ostermann, A. Heine, G. Klebe, **Intriguing Role of Water in Protein-Ligand Binding Studied by Neutron Crystallography on Trypsin Complexes**, *Nat. Comm.* **2018**, *9*, 3559.
1. J. Schiebel, R. Gaspari, A. Sandner, K. Ngo, C. Sohn, H.-D. Gerber, A. Cavalli, A. Ostermann, A. Heine, G. Klebe, **Charges Shift Protonation: Neutron Diffraction Reveals that Aniline and 2-Aminopyridine Become Protonated Upon Binding to Trypsin**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4887-4890.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Synthese von D-Phe/D-DiPhe-Pro-basierenden Liganden und deren biophysikalischen Charakterisierung zur Selektivitätsstudie von Thrombin und Trypsin sowie ein synthetischer Beitrag zur Darstellung von Inhibitoren der Aldose-Reduktase und Carboanhydrase II“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 03.01.2020

.....
Trong Khang Ngo